

Ante Medić

**Utjecaj različitih vrsta ciklodekstrina na
antioksidativni kapacitet i ukupni sadržaj fenola
suhih ekstrakata komine masline**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Zahvaljujem se izv.prof.dr.sc. Dubravki Vitali Čepo na dobroj suradnji i stručnom mentorstvu. Također se zahvaljujem asistentici Kristini Radić na strpljenju i korisnim savjetima.

Puno hvala mojim roditeljima koji su mi sve omogućili i uvijek bili potpora.

Hvala svim mojim kolegama i prijateljima koji su bili uz mene za vrijeme studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Maslina	1
1.2. Kemijski sastav ploda masline i maslinovog ulja.....	3
1.3. Biološki učinci fenola masline	5
1.3.1. Zaštita od oksidativnog stresa i upale	5
1.3.2. Smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti	5
1.3.3. Smanjenje rizika za razvoj karcinoma	6
1.3.4. Usporavanje procesa povezanih sa starenjem.....	6
1.3.5. Utjecaj na mikrobiotu	6
1.4. Proces proizvodnje maslinovog ulja.....	7
1.4.1. Diskontinuirani proces ekstrakcije maslinovog ulja	8
1.4.2. Trofazni kontinuirani proces ekstrakcije maslinovog ulja.....	8
1.4.3. Dvofazni kontinuirani proces ekstrakcije maslinovog ulja.....	8
1.5. Nusprodukti procesa proizvodnje maslinovog ulja	9
1.5.1. Komina masline	9
1.5.2. Otpadna voda	9
1.5.3. TPOMW (otpad dvofaznog mlina)	9
1.5.4. Korisni spojevi nusprodukata	9
1.5.5. Moguće upotrebe nusprodukata	10
1.6. Upotreba ciklodekstrina u proizvodima dodane vrijednosti.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali	13
3.1.1. Uzorci komine masline	13
3.1.2. Oprema.....	14
3.1.3. Kemikalije.....	14
3.2. Metode	15
3.2.1. Plan istraživanja	15
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.....	15

3.2.2.1. Priprema mjernih otopina i mjerenje apsorbancije	16
3.2.2.2. Izrada baždarnog dijagrama	16
3.2.3. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom	17
3.2.3.1. Priprema mjernih otopina i mjerenje apsorbancije	18
3.2.3.2. Izrada baždarnog dijagrama	18
3.3. Statistička obrada podataka	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Rezultati.....	21
4.2. Rasprava	27
5. ZAKLJUČCI	33
6. LITERATURA.....	34
7. SAŽETAK/SUMMARY	41
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Maslina

Maslina (lat. *Olea europaea*, Oleaceae) je vazdazeleni grm ili stablo, visoko većinom 8-15 metara, sa srebrno-zelenim, eliptičnim lišćem duljine 4-10 cm i širine 1-3 cm. Cvjetovi su mali, bijeli i niču u grozdovima iz aksila listova. Plod je koštunica duga 1-2.5 cm s mesnatim usplođem i sjemenkom u sredini. Prirodna boja ploda je većinom zelena do ljubičasta, dok su konzervirane crne masline većinom obojane željezovim (II) glukonom. Maslina je autohtona biljka Mediteranskih zemalja i određenih dijelova Azije i Afrike. Najrasprostranjenije podvrste su: *Olea europaea* subsp. *europaea* (karakteristična za Mediteran), *Olea europaea* subsp. *guanchica* (Kanarsko otočje), *Olea europaea* subsp. *cerasiformis* (arhipelag Madeira), *Olea europaea* subsp. *maroccana* (Maroko), te *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Alžir, Sudan, Niger) (Besnard i sur., 2009; Green, 2002). Stotine je različitih kultivara masline, nastalih prirodnom divergencijom u različitim uvjetima ili selektivnim uzgojem. Za divlje vrste masline se ponekad upotrebljava skupni latinski naziv: *Olea oleaster*. Samo duž Jadranske obale i u njejoj unutrašnjosti se uzgaja oko 60 različitih sorti masline. Sorte se međusobno razlikuju karakteristikama ploda: bojom, omjerom veličine usplođa i sjemenke, sadržajem i kvalitetom maslinovog ulja. Tako se određene sorte uzgajaju za proizvodnju maslinovog ulja, a određene sorte se nazivaju stolnima i uzgajaju se radi ploda (Garrido Fernandez i sur., 1997). Kod uzgoja određene sorte bitno je obratiti pozornost na klimatske uvjete, kvalitetu tla, opskrbu vodom, samooplodnost ili stranooplodnost maslina. Neke od autohtonih hrvatskih sorti masline su: Istarska Bjelica, Oblica, Lastovka, Levantinka, Buža, Crnica, Drobnica i Rosinjola. Oko 95% stabala masline se nalazi u Mediteranskim zemljama koje na čelu sa Španjolskom, Italijom i Grčkom zauzimaju najveći udio u svjetskoj proizvodnji maslina i maslinovog ulja. Značajniji veći proizvođači su također Turska, Tunis i Maroko.

Tablica 1. Svjetska i europska proizvodnja i potrošnja maslinovog ulja za 2016./17. prema: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>

Svjetska i europska proizvodnja/potrošnja maslinovog ulja (1000 tona) 2016./17.							
Proizvodnja (svijet)		Potrošnja (svijet)		Proizvodnja (EU)		Potrošnja (EU)	
EU	1747,5	EU	1463,0	Španjolska	1286,6	Italija	514,0
Turska	177,0	USA	315,0	Grčka	195,0	Španjolska	457,2
Maroko	110,0	Turska	155,0	Italija	182,3	Grčka	105,0
Sirijska	110,0	Maroko	120,0	Portugal	69,4	Francuska	94,0
Hrvatska	5,1	Hrvatska	8,8	Hrvatska	5,1	Hrvatska	8,8

Tablica 1. Prikazuje najveće svjetske i europske proizvođače i potrošače maslinovog ulja 2016./17. Hrvatski podatci su prikazani radi usporedbe.



Slika 1. Stablo masline (prilagođeno prema www.poslovni.hr)



Slika 2. Plod masline (prilagođeno prema www.agroklub.com)

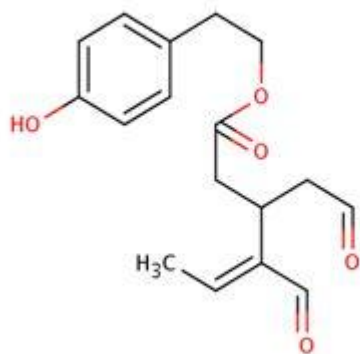
1.2. Kemijski sastav ploda masline i maslinovog ulja

Kemijski sastav maslinovog ulja i ploda masline ovisi o nizu faktora kao što su: vrsta masline, klimatski uvjeti, kvaliteta tla i vodoopskrbe, stupanj zrelosti, vrijeme berbe itd.

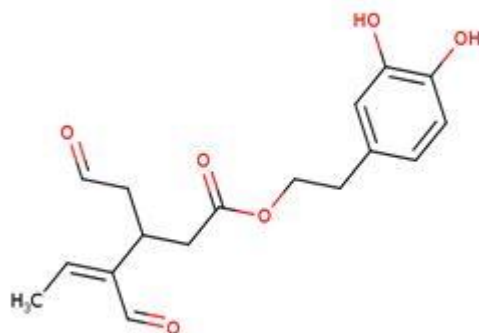
Bioaktivni spojevi maslina i maslinovog ulja se mogu podijeliti na neosapunjive tvari (skvalen, tokoferol, steroli, triterpeni) i polarne fenole (hidroksitirosol, tirosol, dialdehidne forme dekarboksimetil-elenolne kiseline povezane s tirosolom i hidroksitirosolom, glikozidi poput oleuropeina i ligstrozida te njihovi aglikoni, lignani, fenolne kiseline). Fenoli su spojevi s jednom ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten. U literaturi se polarni fenoli često poistovjećuju s polifenolima masline. Međutim potrebno je napraviti distinkciju jer su polifenoli u ukupnom sadržaju fenola prisutni u tragovima. Također, potrebno je razlikovati polarne fenole od nepolarnih fenola kao što su tokoferoli koji spadaju u neosapunjive tvari. (Boskous D, 2015).

Glavni fenolni spojevi ploda masline su: antocijani (glukozidi cijanidina), flavonoli (većinom kvercetin-3-rutinozidi), flavoni (većinom glukozidi luteolina i apigenina), fenolne kiseline (hidroksibenzojeva, hidroksicimetna i dr.), fenolni alkoholi (tirosol, hidroksitirosol i dr.), sekoiridoidni glikozidi (oleuropein, ligstrozid, demetiloleuropein i dr.), verbaskozidi i lignani (Franco i sur., 2014; Lama-Munoz i sur., 2013; Kanakis i sur., 2013; Alagna i sur., 2012; Silva i sur., 2006; Vinha i sur., 2005).

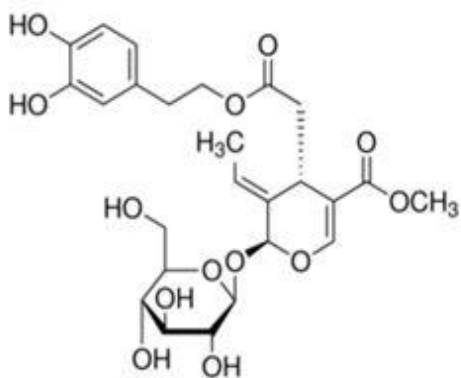
U maslinovom ulju je sadržaj fenola drugačiji nego u plodu. Fenolni spojevi se sintetiziraju kad se pomiješaju enzimi i supstrati za vrijeme gnječenja ploda masline. Svako maslinovo ulje ima različit sastav fenolnih komponenti. Međutim, generalno prevladava nekoliko vrsta fenola: dialdehidne forme dekarboksimetil-elenolne kiseline povezane s tirosolom (p-HPEA-EDA) i hidroksitirosolom (3,4-DHPEA-EDA) te aglikoni oleuropeina i ligstrozida. Nakon njih slijede lignani, tirosol i hidroksitirosol. Koncentracija fenolnih kiselina je generalno niska. (Franco i sur., 2014; Perez i sur., 2014; Kanakis i sur., 2013; Saitta i sur., 2010; Segura-Carretero i sur., 2010; Bendini i sur., 2007; Christophoridou i sur., 2005.). Koncentracije tirosola i hidroksitirosola u svježem maslinovom ulju su većinom niske, a povećavaju se s vremenom zbog hidrolize sekoiridoida.



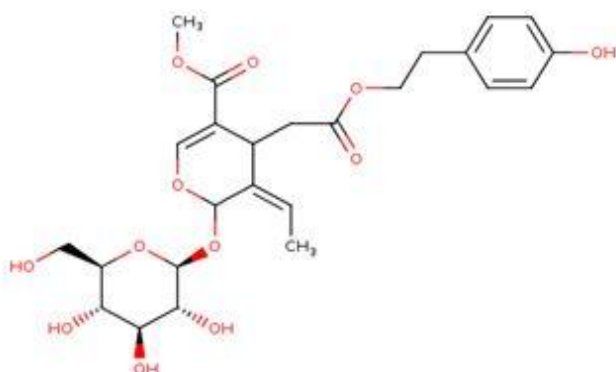
Slika 3. p-HPEA-EDA
dekarboksimetil-elenolna kis.+ tirosol
(prilagođeno prema shaker.umh.es)



Slika 4. 3,4-DHPEA-EDA
dekarboksimetil-elenolna kis. + hidroksitirosol
(prilagođeno prema phenol-explorer.eu)



Slika 5. Oleuropein
(prilagođeno prema www.sigmaaldrich.com)



Slika 6. Ligstrozin
(prilagođeno prema phenol-explorer.eu)

1.3. Biološki učinci fenola masline

Mediterranska prehrana je, između ostalog, karakteristična po visokom unosu masti, (gotovo 40% dnevnih energetske potrebe) prvenstveno iz maslinovog ulja. Zemlje južne Europe pokazuju najmanju pojavnost infarkta miokarda (Tunstall-Pedoe i sur., 1999). Mnoge studije su istraživale povezanost mediteranske prehrane i smanjenja ukupnog mortaliteta (Trichopoulou i sur. 2003), mortaliteta od kardiovaskularnih bolesti (De Lorgeril i sur., 1999), te pojavnosti neurodegenerativnih bolesti (Scarmeas i sur., 2006). Tradicionalno su se povoljni učinci pripisivali visokom sadržaju oleinske kiseline u maslinovom ulju, međutim, novija saznanja govore kako su za te učinke odgovorni i fenolni spojevi. Tome u prilog idu i brojni znanstveni radovi (Martín-peláez i sur., 2013).

1.3.1. Zaštita od oksidativnog stresa i upale

Kao prirodni antioksidansi, fenolni spojevi mogu neutralizirati egzo- i endogene reaktivne kisikove spojeve čije mete su lipidi, DNA i proteini. Fenolne komponente ekstra djevičanskog maslinovog ulja imaju snažan protuupalni učinak in vivo i in vitro (Lopez-Miranda i sur., 2010; Tripoli i sur., 2005). Kod pretilih osoba je dokazana in vivo inhibicija NFkB, važnog proupalnog faktora (Perez-Herrera i sur., 2012).

1.3.2. Smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti

Neki od čimbenika rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti su: povišena koncentracija oksidiranog LDL-a (prema eng. low-density lipoprotein), snižena koncentracija funkcionalnog HDL-a (prema eng. high-density lipoprotein), povišen krvni tlak te pojačano zgrušavanje krvi. Oksidirane LDL čestice fagocitiraju makrofazi što doprinosi razvoju aterosklerotskih plakova koji su važan dio etiologije najvećeg broja kardiovaskularnih bolesti. HDL čestice imaju ulogu reverznog transporta kolesterola iz makrogafa i sprječavaju nastanak aterosklerotskih plakova. Povišen krvni tlak uzrokuje povećanu vjerojatnost oštećenja stijenke krvne žile, dok pojačano zgrušavanje povećava rizik od tromboembolijskih incidenata. Fenoli masline imaju znanstveno dokazan pozitivan učinak na sve navedene čimbenike. Pokazalo se da je trodnevno konzumiranje suncokretovog ulja obogaćenog hidroksitirozolom smanjilo razine oksidiranog LDL-a kod zdravih pojedinaca (Vázquez - Velasco i sur., 2011). Također, provedeno je ispitivanje na 40 žena sa stabilnom koronarnom bolesti srca, koje je pokazalo da maslinovo ulje bogatije fenolnim komponentama (161

mg/kg) jače djeluje na smanjenje razine oksidiranog LDL-a od maslinovog ulja siromašnijeg fenolnim komponentama (15mg/kg) (Fito i sur., 2005).

Studije su pokazale da oksidacija HDL-a smanjuje njegovu funkcionalnost (Shao i sur., 2012). Može se pretpostaviti da bi određeni fenoli masline, zbog svojih antioksidativnih svojstava, mogli spriječiti oksidativnu inaktivaciju HDL-a. Što se tiče hipertenzije, provedeno je randomizirano, dvostruko slijepo ispitivanje na grupi od 24 mlade žene s 1. stupnjem hipertenzije i primijećeno je smanjenje krvnog tlaka kod žena koje su konzumirale maslinovo ulje bogato fenolima (Moreno-Luna i sur., 2012). DHPE (2-(3,4-di-hidroksifenil)-etanol) - jedan od fenolnih spojeva maslinovog ulja je pokazao antiagregacijski učinak i smanjenje sinteze eikozanoida in vitro u koncentraciji od 400 mM (Petroni i sur., 1995).

Također, pokazano je da hidroksitirozol potiče apoptozu glatkih mišićnih stanica (Zrelli i sur., 2011).

1.3.3. Smanjenje rizika za razvoj karcinoma

U patofiziologiji karcinoma mogu biti oksidativna oštećenja molekule DNA. In vivo (Salvini i sur., 2006; Weinbrenner i sur., 2004) i in vitro studije (Quiles i sur., 2002) su pokazale protektivni učinak fenola masline na DNA oksidaciju. Epidemiološke studije su pokazale da konzumiranje maslinovog ulja smanjuje prevalenciju određenih tipova karcinoma (Psaltopoulou i sur., 2011).

1.3.4. Usporavanje procesa povezanih sa starenjem

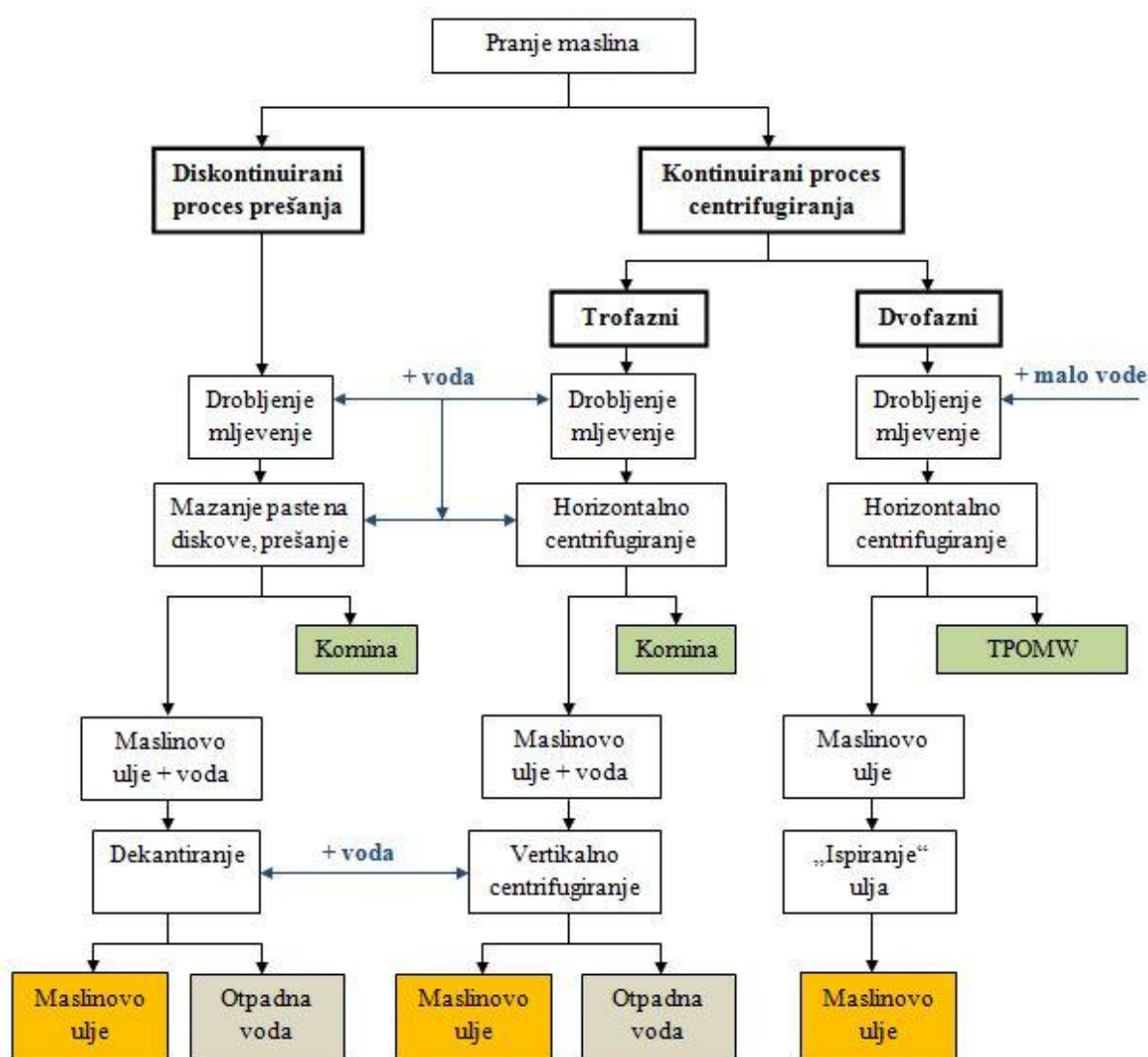
Prema slobodno-radikalnoj teoriji starenja (Harman, 1956), starenje se može povezati s akumulacijom oksidativnih oštećenja u organizmu. U tom kontekstu, fenoli masline bi mogli usporiti proces starenja vezan za oksidativni stres.

1.3.5. Utjecaj na mikrobiotu

Pokazalo se da fenoli masline mogu promovirati rast određenih korisnih sojeva bakterija kao što su *Lactobacillus* spp. (Landete i sur., 2008). Postoji velika mogućnost da promjene sastava gastrointestinalne mikroflore smanjuju razine kolesterola u krvi (Martinez i sur., 2009), međutim, još uvijek se ne poznaju točni mehanizmi.

1.4. Proces proizvodnje maslinovog ulja

U ovom poglavlju ukratko su opisani uobičajeni procesi ekstrakcije maslinovog ulja. Kvaliteta maslinovog ulja se definira prema sadržaju slobodnih masnih kiselina (izraženih kao oleinska kiselina). Djevičanska maslinova ulja su dobivena direktno iz ploda masline, samo mehaničkim postupcima, pri temperaturi koja neće izazvati promjenu kemijskog sastava i bez upotrebe dodatnih kemikalija (npr. hladno prešanje ili centrifugiranje). Ekstra djevičansko maslinovo ulje smije imati maksimalno 0.8g slobodnih kiselina/100g ulja, a djevičansko maslinovo ulje smije imati maksimalno 2g slobodnih kiselina/100g ulja.



Slika 7. Shema kontinuiranog i diskontinuiranog procesa ekstrakcije maslinovog ulja

1.4.1. Diskontinuirani proces ekstrakcije maslinovog ulja

Diskontinuirani proces (Slika 7.) je najstariji i najrašireniji proces ekstrakcije maslinovog ulja. Oprane masline se zdrobe/samelju i dobivena pasta se razmaže po diskovima od sintetskih vlakana. Tlak se aplicira prešom, kako bi se emulzija vode i ulja odvojila od krutog ostatka. Takav kruti ostatak se naziva kominom masline. Emulzija se dekantira kako bi se dobilo čisto ulje. Pritom se dodaju male količine vode kako bi se ulje lakše odvojilo. Generiraju se ukupno tri različite frakcije: maslinovo ulje, komina i otpadna voda. Prednosti procesa su jeftinost, tehnička jednostavnost i manja količina otpadne vode u odnosu na trofazni kontinuirani proces (40-60L/100kg maslina). Mane su diskontinuiranost procesa i potreba za većim brojem djelatnika, te produkcija značajnih količina otpadne vode.

1.4.2. Trofazni kontinuirani proces ekstrakcije maslinovog ulja

U trofaznom procesu se za odvajanje ulja umjesto aplikacije tlaka i dekantiranja koriste horizontalno i vertikalno centrifugiranje (Slika 7.). Generiraju se ukupno tri različite frakcije: maslinovo ulje, komina i otpadna voda. Prednosti procesa su kompletna automatizacija, manja potreba za prostorom i bolja kvaliteta maslinovog ulja. Mane su veća potrošnja energije, skuplja instalacija i generiranje veće količine otpadne vode u odnosu na diskontinuirani proces (80-120L/100kg maslina) (Alburquerque i sur., 2004).

1.4.3. Dvofazni kontinuirani proces ekstrakcije maslinovog ulja

Dvofazni proces je razvijen kako bi se smanjila potrošnja vode i ispiranje vodotopljivih fenola. U dvofaznom procesu se koristi horizontalno centrifugiranje kojim se generiraju ukupno dvije frakcije: maslinovo ulje koje se dodatno ispire i TPOMW (two-phase olive-mill waste ili otpad dvofaznog mlina) iz kojeg se može iscrpiti dodatna količina maslinovog ulja koristeći ekstrakcijska otapala ili centrifugiranje. Prednosti su automatizacija procesa i manja količina nusprodukta (10L/100kg maslina). Mana procesa je teže zbrinjavanje nusprodukta koji sadrži veliku koncentraciju toksičnih tvari (McNamara i sur., 2008). 90% svih mlinova u Španjolskoj su dvofazni. Ovaj proces se često koristi i u Hrvatskoj.

1.5. Nusprodukti procesa proizvodnje maslinovog ulja

1.5.1. Komina masline

Komina masline je kruti ostatak generiran u diskontinuiranom i trofaznom kontinuiranom procesu ekstrakcije maslinovog ulja. Sadrži ostatke sjemenki i pulpe, kožice i vodu. Komina dobivena diskontinuiranim procesom ima manji udio vode od one dobivene trofaznim kontinuiranim procesom.

1.5.2. Otpadna voda

Otpadna voda je umjereno kisela, crna do crvena tekućina visoke vodljivosti. Generira se u diskontinuiranom i trofaznom kontinuiranom procesu ekstrakcije maslinovog ulja. Predstavlja najveći ekološki problem zbog negativnog učinka na mikroorganizme tla (Paredes i sur., 1987.), vodene ekosustave (Della Greca i sur., 2001) i zrak (Rana i sur., 2003) zbog emisije fenola i sumporovog dioksida.

1.5.3. TPOMW (otpad dvofaznog mlina)

TPOMW (two-phase olive-mill waste ili otpad dvofaznog mlina) je gusti mulj koji sadrži komadiće sjemenki i pulpe masline i dio vegetacijske vode. Generira se u dvofaznom kontinuiranom procesu ekstrakcije maslinovog ulja. To je frakcija koja sadrži kominu i otpadnu vodu.

1.5.4. Korisni spojevi nusprodukata

Nusprodukti procesa proizvodnje maslinovog ulja sadrže brojne toksične ali i korisne spojeve čiji sastav ovisi o vrsti masline, primijenjenim agronomskim tehnikama, ekstrakcijskom procesu, klimatskim uvjetima i uvjetima skladištenja. Glavni sastojci komine i TPOMW-a osim vode su celuloza, hemiceluloza i lignin, ali prisutni su i drugi, vrijedniji spojevi (Rodriguez i sur., 2008). U nastavku je naveden sadržaj pojedinih skupina spojeva kao što su proteini, šećeri, lipidi i fenolni spojevi.

Po sadržaju proteina prednjače komina (3,43-7,26%) i TPOMW (2,87-7,2%) (Molina-Alcaide i sur., 2008; Alburquerque i sur., 2004; Vlyssides i sur., 1998).

Lipidi su, kao teže topljive komponente, manje zastupljeni u otpadnoj vodi (0,03-4,25%) a zastupljeniji u komini (3,5-8,72%) i napose TPOMW-u (3,76-18,0%) (Baeta-Hall i sur., 2005; Paredes i sur., 1999; Vlyssides i sur., 1998; Borsani i sur., 1996).

Šećeri, kao vodotpljive supstancije, imaju visok sadržaj u frakciji otpadne vode (1.5-12.22%) i TPOMW-u (0.83-19.3%) a nešto niži sadržaj u komini (0.99-1.38%) (Vlyssides i sur., 2004; Caputo i sur., 2003; Paredes i sur., 1999; Vlyssides i sur., 1998).

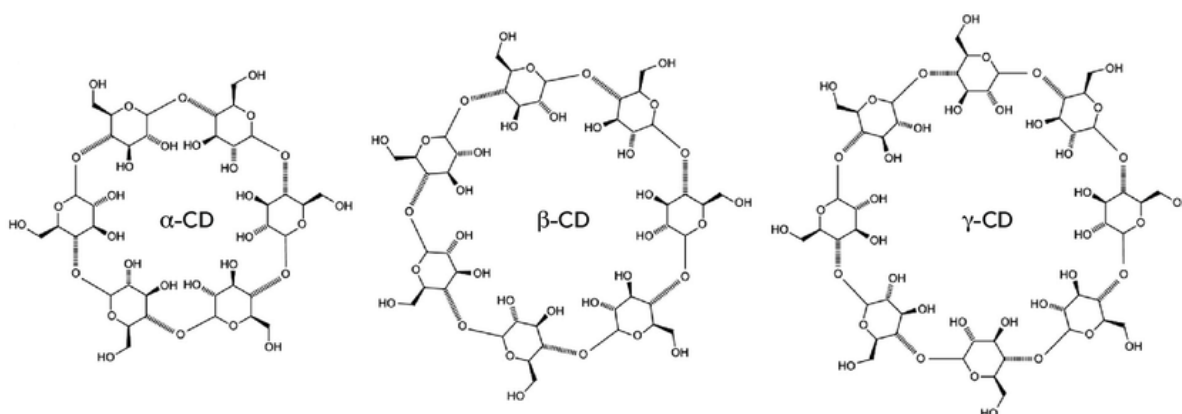
Sadržaj ukupnih fenola, kao vodotopljivih supstancija, je najviši u otpadnoj vodi (0,63-5,45%), a nešto niži u TPOMW-u (0,4-2,43%) i komini (0,2-1,146%) (Yangui i sur., 2009; Martin Garcia i sur., 2003; Caputo i sur., 2003). Glavne skupine fenolnih spojeva u nusproduktima su fenolne kiseline, sekoiridoidi i flavonoidi (Dermeche i sur., 2013).

Nusprodukti su također bogati mineralima. Primjerice, otpadna voda sadrži puno kalija.

1.5.5. Moguće upotrebe nusprodukata

Nusprodukti proizvodnje maslinovog ulja imaju brojne potencijalne upotrebe. Međutim, većina potencijala ostaje neiskorištena. Neke od potencijalnih upotreba su: proizvodnja biogoriva, biopolimera i hrane za životinje, te iscrpljivanje korisnih spojeva kao što su fenoli i polisaharidi.

1.6. Upotreba ciklodekstrina u proizvodima dodane vrijednosti



Slika 8. Struktura ciklodekstrina (prilagođeno prema www.researchgate.net)

Nusprodukti koji se generiraju za vrijeme proizvodnje prehrambenih proizvoda (npr. komina masline kod proizvodnje maslinovog ulja) mogu još uvijek sadržavati značajnu količinu korisnih komponenti (npr. fenoli kome masline). Ukoliko se fizikalnim i/ili kemijskim postupcima iz određenog nusprodukta uspije ukoncentrirati i pročistiti korisna supstancija koja će za vrijeme procesiranja zadržati stabilnost i dati prehrambeni proizvod koji udovoljava standardima, tada se govori o proizvodu dodane vrijednosti. Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi sastavljeni od 5 ili više α -D-glukopiranozidnih jedinica (Slika 8.). Razlikuju se veličinom i svojstvima. U centralnu šupljinu ciklodekstrina se, s određenim afinitetima, mogu uklopiti razni spojevi, što rezultira njihovom promijenjenom stabilnošću ili topljivošću. α , β i γ ciklodekstrini su prema FDA-u (Food and Drug Administration) svrstani u GRAS (Generally Recognized As Safe) supstancije i sukladno tome se smiju upotrebljavati kao ekscipijensi u prehrambenim proizvodima. Ciklodekstrini se mogu koristiti za povećanje ekstraktibilnosti spojeva slabo topljivih u vodi i na taj način povećati njihov prinos u procesu dobivanja proizvoda dodane vrijednosti. Naime, vanjska površina ciklodekstrina je hidrofilnija od unutarnje tako da se u centralnu šupljinu može inkorporirati slabo topljiv spoj koji će u ovakvom inkluzijskom kompleksu imati veću topljivost. Osim za povećanje ekstraktibilnosti, ciklodekstrini se mogu koristiti i za povećanje stabilnosti određenih spojeva, u vidu zaštite od oksidacije, svjetlosti i topline. Na taj način mogu produljiti rok trajanja određenih proizvoda. Brojni radovi citirani u poglavlju 4.2. svjedoče o utjecaju ciklodekstrina na topljivost i stabilnost određenih spojeva. Neke od ostalih upotreba ciklodekstrina su: povećanje bioraspoloživosti lijeka, kompleksiranje kolesterola za dobivanje proizvoda bez kolesterola, kompleksiranje boja i mirisa, kompleksiranje etanola u pripravi instant alkoholnih pića.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Komina masline dobivena za vrijeme dvofaznog procesa ekstrakcije maslinovog ulja (TPOMW), još uvijek sadržava znatnu količinu biološki aktivnih komponenti kao što su fenoli masline i razni antioksidansi. Zbrinjavanje ekotoksičnih otpadnih voda i komine masline u zemljama s razvijenom proizvodnjom maslinovog ulja postaje veliki ekološki problem. U novije vrijeme se ulažu napor i kako bi se pronašli načini prerade ovakvih nusprodukata u korisne proizvode, što bi smanjilo količinu neadekvatno zbrinutog otpada. Komina masline bi se, zbog visokog sadržaja fenola i drugih antioksidativnih sastavnica, mogla koristiti za dobivanje prehrambenih proizvoda dodane vrijednosti. Ciklodekstrini u tom procesu mogu biti jako korisni jer kompleksiranje raznih spojeva ciklodekstrinima može povećati njihovu stabilnost u raznim uvjetima. Također, pojedini ciklodekstrini su prepoznati kao GRAS (Generally Recognized As Safe) supstancije i smiju se upotrebljavati u prehrambenim proizvodima. Cilj ovog ispitivanja je istražiti utjecaj različitih vrsta ciklodekstrina dodanih u fazi ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet suhih ekstrakata komine masline, uzete iz dvofaznog mlina. Suhi ekstrakti komine su čuvani u različitim uvjetima temperature i prisustva svjetlosti te su tijekom trajanja skladištenja uzorkovani u pravilnim vremenskim razmacima. Dobiveni rezultati pružit će nove informacije o mogućnostima primjene različitih vrsta/koncentracija ciklodekstrina u svrhu produljenja roka trajanja (shelf life) nutraceutika na bazi komine masline.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci komine masline

Komina masline je uzeta iz dvofaznog mlina nakon proizvodnje maslinovog ulja te unutar nekoliko sati smrznuta na -20 °C kako bi se spriječio raspad važnih sastavnica. Uslijedilo je sušenje u termostatu na velikim Petrijevim zdjelama tokom 24 h na 60 °C kako bi se uklonila suvišna voda i ukupan udio vode smanjio na < 2%. Dobivena osušena masa je usitnjena u tarioniku i mlinu te prosijana kroz sito veličine pora 0,8 mm kako bi se uzorak homogenizirao i uklonile koštice. Nakon toga je uslijedilo odmašćivanje usitnjenog, homogenog uzorka pomoću Soxhlet uređaja u trajanju od 2 h za 5 g uzorka, s petroleterom kao ekstrakcijskim sredstvom. Na taj način je uklonjena uljna komponenta koja bi ometala daljnju analizu. Tako odmašćeni uzorci se 2 h ekstrahiraju u vodenoj kupelji, na temperaturi od 70 °C uz 110 rpm i 400 mL 60% etanola kao ekstrakcijskog sredstva, bez ciklodekstrina i uz dodatak raznih vrsta ciklodekstrina, prema prethodno optimiranom postupku (Tablica 2.). Dobiveni ekstrakti se filtriraju i alikvotiraju u tikvice za uparavanje. Potom se uparavaju na temperaturi od 50 °C i uz tlak od cca 60 mbar-a, s ciljem uklanjanja etanola koji se ne bi mogao smrznuti na -20 °C i onemogućio bi liofilizaciju. Kao zadnji korak pripreme suhih ekstrakata, vrši se liofilizacija u trajanju od 48h. Cilj liofilizacije je osušiti uzorak na niskim temperaturama, kako ne bi došlo do raspada važnih sastavnica. Dobiveni suhi ekstrakti se čuvaju u dva tipa uvjeta: **CASE 1:** 4 °C, relativna vlažnost 75%, 180 dana i **CASE 4:** 60 °C, relativna vlažnost 75%, 45 dana.

Tablica 2. Masena koncentracija komine masline i ciklodekstrina za vrijeme ekstrakcije

Broj uzorka	Vrsta ciklodekstrina	Masena koncentracija komine / gL ⁻¹	Masena koncentracija ciklodekstrina / gL ⁻¹
1	bez ciklodekstrina	20	0
2	β	20	8
3	nasumično metilirani β (RAMEB)	20	8
4	nasumično metilirani β (RAMEB)	20	16
5	hidroksi propil β	20	8
6	hidroksi propil β	20	16
7	γ	20	8
8	γ	20	16

3.1.2. Oprema

Termostat (INKO)
Soxhlet aparatura (INKO SK6ESS) + Petroleum ether (CARLO ERBA REAGENTS V7L559307L)
Metalna sita (Prüfsieb DIN 4188)
Liofilizator (Christ Alpha 1-4 LOC-1) + mast za pomašćivanje (Vacuum grease, Sigma Aldrich 18405)
Vakuumpumpa (Leybold Trivac D 2,5 E) + ulje za pumpu (Leybonol LVO 100)
Büchi Vacuum controller V-800
Büchi Heating bath B-490
Vakuumpumpa (Büchi Vac V-500)
Analitička vaga (Mettler Toledo-AB265-3)
Uv-Vis spektrofotometar (Aquarius CECIL CE 7200)
Vodena kupelj (GFL- 1086)
pH-metar (Metrohm - 702 SM Titrino)
Vortex (Harmony - Mixer VTX-3000L)
Uređaj za dobivanje ultračiste vode (Ionenaustauscher S4 type P2-30)

3.1.3. Kemikalije

Odmašćivanje	Petroleum ether (CARLO ERBA REAGENTS V7L559307L)
Liofilizacija	Mast za pomašćivanje (Vacuum grease, Sigma Aldrich)
	Ulje za pumpu (Leybonol LVO 100)
Ekstrakcija	Etanol (Kemika d.o.o.)
Folin-Ciocalteu	Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich F9252)
	Bezvodni Na_2CO_3 (Lach-Ner 30217-APO) - za pripremu 6% otopine Na_2CO_3
TEAC	ABTS (Sigma-A9941-50TAB) - za pripremu 7 mM otopine ABTS-a; tabletu od 10 mg ABTS-a otopiti u 2.6 mL destilirane vode
	Kalijev persulfat (Kemika-11241) - za pripremu 2.45 mM otopine $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$; 3.31 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ otopiti u 5 mL destilirane vode
	Otopina ABTS radikala - miješanjem otopine ABTS-a i kalijevog persulfata u jednakim omjerima

3.2. Metode

3.2.1. Plan istraživanja

Dobiveni suhi ekstrakti se uzorkuju 45., 90., 135. i 180. dan (**CASE 1**), 15., 30. i 45. dan (**CASE4**), suše, i od njih se prave stock otopine. Stock otopine zero uzoraka se prave neposredno nakon liofilizacije i analiziraju („nulti“ dan), a ostale neposredno nakon uzorkovanja. Suhi ekstrakti, s obzirom na različite udjele ciklodekstrina, sadrže različite masene udjele komine masline. Stoga se stock otopine pripremaju na način da koncentracija čiste komine masline u svakoj stock otopine bude jednaka kako bi dobiveni rezultati bili usporedivi. Za uzorke kojima su za vrijeme ekstrakcije dodani ciklodekstrini, bilo je potrebno odvagati veću količinu suhog ekstrakta za pripremu stock otopine, jer je maseni udio komine masline u takvim uzorcima manji u odnosu na uzorak bez ciklodekstrina (Tablica 3.). Takve stock otopine se upotrebljavaju za izradu razrijeđenih otopina za određivanje sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnog potencijala primjenom spektrofotometrijske Folin-Ciocalteu i TEAC metode.

Tablica 3. Masene koncentracije suhog ekstrakta potrebne za pripravu stock otopina

Masena koncentracija ciklodekstrina / gL ⁻¹	Masena koncentracija suhog ekstrakta / gL ⁻¹
0	50
8	90
16	130

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu metoda (Singleton i Rossi, 1965) služi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u određenom uzorku. Naime, Folin-Ciocalteu reagens se sastoji od fosfomolibdata i fosfovolframata žute boje. Hidroksilne skupine fenola sposobne su u alkalnim uvjetima reducirati fosfomolibdate i fosfovolframate pri čemu nastaju plavo obojeni kompleksi W (VI) i Mo (VI) nerazjašnjene strukture i maksimuma apsorpcije svjetlosti na 725 nm. Intenzitet plavog obojenja je proporcionalan koncentraciji fenolnih spojeva tako da se mjerenjem apsorbancije, uz odgovarajući standard, lako može odrediti njihov sadržaj.

3.2.2.1. Priprema mjernih otopina i mjerenje apsorbancije

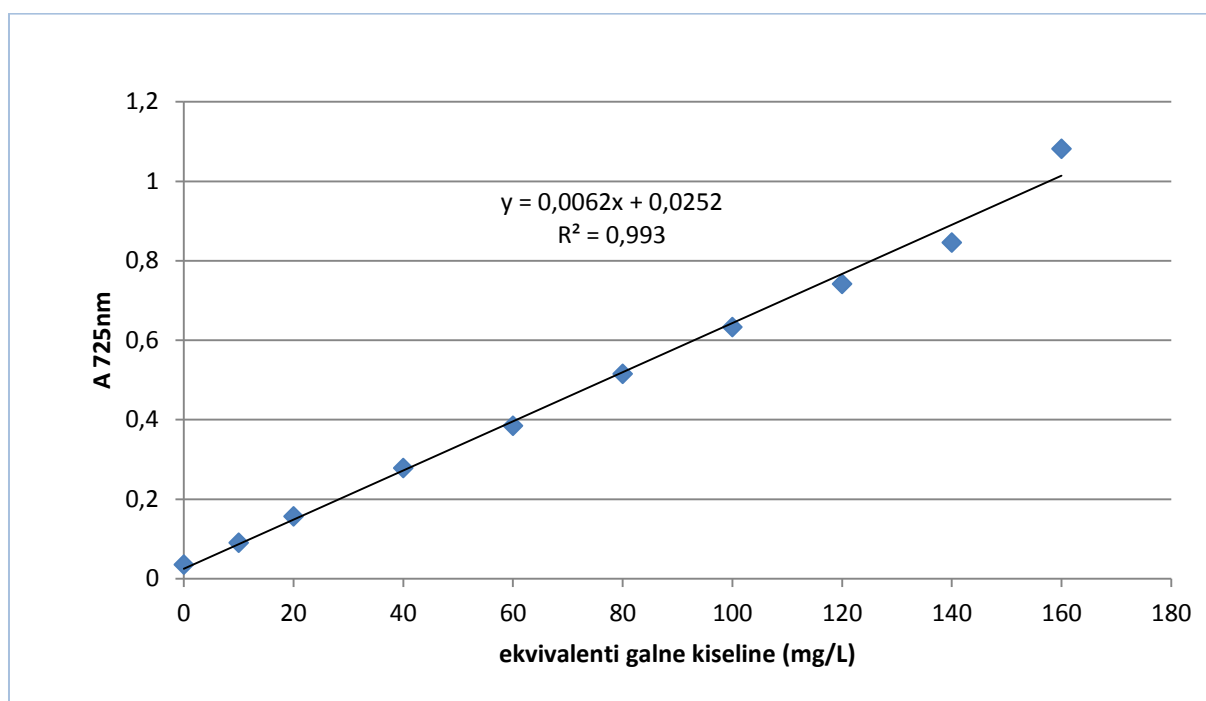
Stock otopine uzoraka je potrebno razrijediti 20 puta, jer je empirijski utvrđeno da je raspon vrijednosti mjerenih apsorbancija za takvo razrijeđenje 0,1-1 što odgovara radnom području spektrofotometra. 40 µL stock otopine se razrijedi destiliranom vodom do 800 µL. 200 µL 20 puta razrijeđene otopine se otpipetira u Falcon kivetu od 15 mL. U smjesu se doda 150 µL Folin-Ciocalteu reagensa i 1,35 mL destilirane vode i dobro promućka. Nakon 5 minuta se doda 1,5 mL 6% (w/v) Na₂CO₃ kako bi se smjesa zalužila i dobro promućka. Javlja se plavo obojenje. Smjesa se inkubira 30 minuta na 50 °C kako bi se ubrzala reakcija. Nakon inkubacije, smjesa se ohladi pod mlazom hladne vode. Apsorbancija se mjeri na 725 nm. Ukupan sadržaj fenola u uzorcima izražava se kao ekvivalenti galne kiseline po masi suhog ekstrakta komine, prema baždarnom dijagramu ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline.

3.2.2.2. Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog dijagrama je potrebno napraviti koncentracijski niz standarda galne kiseline. 400 mg galne kiseline se otopi u 10 mL etanola i nadopuni do 100 mL destiliranom vodom. Na taj način se dobije otopina galne kiseline koncentracije 4 mg/mL. 10 mL te otopine se pipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Na taj način se dobije otopina galne kiseline koncentracije 0,4 mg/mL koja služi za izradu koncentracijskog niza otopina galne kiseline od 0-160 µg/mL. Svako u nizu otopina se izmjeri apsorbancija i na temelju dobivenih podataka se izradi baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline. Riječ je o linearnoj funkciji; kad se izračuna apsorbancija određenog uzorka komine masline, na temelju jednadžbe pravca se može izračunati ukupan sadržaj fenola izražen u ekvivalentima galne kiseline.

Tablica 4. Apsorbancija koncentracijskog niza standarda galne kiseline

Koncentracija mg/L	A	STD	RSD (%)
0	0,035	0,006	17,3
10	0,090	0,003	3,2
20	0,157	0,006	3,9
40	0,278	0,007	2,3
60	0,385	0,006	1,4
80	0,515	0,005	0,9
100	0,633	0,019	3,0
120	0,742	0,003	0,4
140	0,846	0,007	0,8
160	1,082	0,006	0,6



Slika 9. Baždarni dijagram: Ovisnost apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

3.2.3. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom

TEAC (engl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) metoda (Re i sur., 1999) se temelji na sposobnosti antioksidansa da neutralizira ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) radikal kation. ABTS radikal kation se generira u reakciji 7 mM otopine ABTS-a i kalijevoeg persulfata kao oksidansa u omjeru 1:1. Pritom se javlja plavo-zeleno obojenje

ABTS radikal kationa. Smjesu ABTS-a i kalijevog persulfata se pušta 12 sati u uvjetima bez svjetlosti kako bi reakcija bila što kvantitativnija. Nastala otopina ABTS radikal kationa se razrijedi tako da njena apsorbancija na 732 nm bude $0,700 \pm 0,02$. U takvu, unaprijed priređenu otopinu se dodaje uzorak potencijalnog antioksidansa i ispituje se njegova sposobnost vezanja radikala koja je proporcionalna brzini obezbojenja plavo-zelene otopine. Antioksidativni potencijal se izražava kao μg ekvivalenta Trolox-a (vodotopljivi oblik vitamina E) u mL ekstrakta. Kako bi to bilo moguće, potrebno je napraviti baždarni dijagram. Ova verzija TEAC-a je napredna jer se direktno generira ABTS radikal kation u reakciji s kalijevim persulfatom, bez stvaranja intermedijernog radikala; slobodni radikal se generira prije dodavanja uzorka s potencijalnim antioksidativnim svojstvima a ne u prisustvu potencijalnog antioksidansa; metoda je primjenjiva na lipofilne i hidrofilne sustave.

3.2.3.1. Priprema mjernih otopina i mjerenje apsorbancije

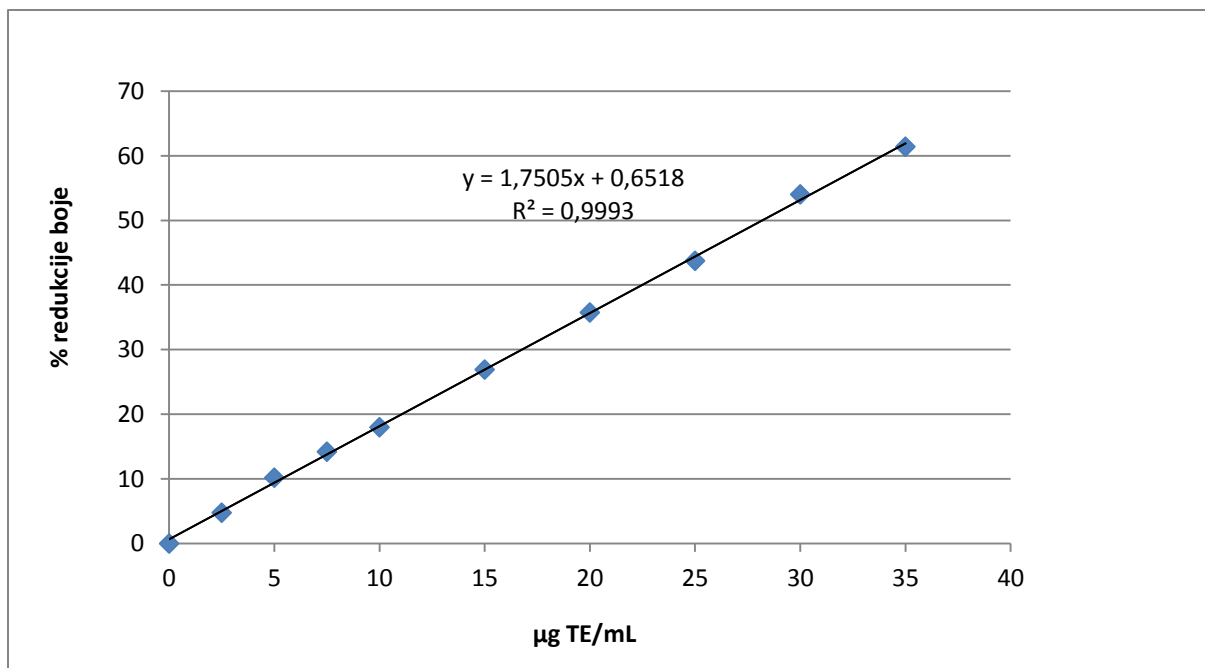
Stock otopine se razrijeđuju 50x (empirijski je određeno da je za to razrijeđenje raspon mjerenih apsorbancija 0,1-1 što odgovara radnom području instrumenta). 2 μL stock otopine se u kiveti razrijedi s 98 μL destilirane vode. U tako pripremljenu otopinu se doda 1167 μL otopine ABTS radikala. Apsorbancija se mjeri na 732 nm, 3 minute nakon dodavanja ABTS radikala. Početnu apsorbanciju ($A_{0\text{min}}$) nije moguće odmah izmjeriti jer je reakcija prebrza pa se za nju uzima vrijednost izmjerena u otopini 100 μL destilirane vode i 1167 μL otopine ABTS radikala (uzorak je zamijenjen destiliranom vodom). Iz razlike početne apsorbancije ($A_{0\text{min}}$) i apsorbancije izmjerene nakon 3 minute ($A_{3\text{min}}$) se izračuna postotak gašenja apsorbancije koji se uvrsti u jednadžbu baždarnog pravca i dobije se antioksidativni potencijal izražen kao μg ekvivalenta Trolox-a u mL ekstrakta. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu.

3.2.3.2. Izrada baždarnog dijagrama

Izradi se koncentracijski niz otopina Trolox-a od 0-40 $\mu\text{g/mL}$. S otopinama se postupa na isti način kao s uzorcima - svakoj otopini se doda 1167 μL otopine ABTS radikala i apsorbancija se izmjeri nakon 3 minute. Sva mjerenja se rade u triplicatu. Na temelju razlike u početnoj apsorbanciji ($A_{0\text{min}}$) i apsorbanciji nakon 3 minute ($A_{3\text{min}}$) dobije se postotak gašenja apsorbancije u ovisnosti o koncentraciji Trolox-a. Izračuna se jednadžba baždarnog pravca i izradi se baždarni dijagram.

Tablica 5. Apsorbancija koncentracijskog niza otopine Trolox-a (ekvivalent Trolox-a, TE)

Koncentracija TE (µg/mL)	A1	A2	A3	% redukcije boje	STD	RSD (%)
0	0,713	0,713	0,713	0	0	0
2,5	0,679	0,677	0,681	4,768583	0,280505	5,882353
5	0,64	0,643	0,638	10,19168	0,352961	3,463227
7,5	0,615	0,609	0,611	14,21225	0,428478	3,014852
10	0,587	0,585	0,582	17,99906	0,352961	1,960996
15	0,52	0,52	0,523	26,92847	0,242924	0,90211
20	0,459	0,458	0,457	35,76438	0,140252	0,392157
25	0,4	0,402	0,401	43,75877	0,140252	0,320513
30	0,33	0,324	0,329	54,04395	0,450849	0,834226
35	0,273	0,277	0,275	61,43058	0,280505	0,456621



Slika 10. Baždarni dijagram: Ovisnost smanjenja apsorbancije o koncentraciji Trolox-a

3.3. Statistička obrada podataka

Za sve uzorke osim zero uzoraka su rađena po dva mjerenja ($n=2$) a za zero uzorke četiri mjerenja ($n=4$). Za računanje srednje vrijednosti, standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (RSD), kao i za izradu grafikona i baždarnih dijagrama korišten je program Microsoft Office Excel, a za dodatnu statističku obradu podataka korišten je GraphPad Prism 3.02. programski paket (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija, te postotni udio antioksidativnog kapaciteta (TEAC) i ukupnog sadržaja fenola (Folin-Ciocalteu) u odnosu na zero uzorke.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

Tablica 6. Rezultati određivanja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom, CASE 1

Uzorak	mg GAE/g uzorka	SD	RSD
1 / ZERO	40,48	0,14	0,35
2 / ZERO	20,53	0,69	3,34
3 / ZERO	21,40	1,06	4,95
4 / ZERO	14,04	0,68	4,82
5 / ZERO	19,93	0,92	4,61
6 / ZERO	13,81	0,67	4,87
7 / ZERO	18,79	0,52	2,79
8 / ZERO	13,02	0,34	2,61

Uzorak	mg GAE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/1/90	38,77	0,15	0,38	95,77
2/1/90	19,85	0,40	2,00	96,70
3/1/90	23,29	0,59	2,51	108,84
4/1/90	12,52	0,33	2,63	89,18
5/1/90	19,13	0,08	0,40	95,96
6/1/90	13,95	0,35	2,48	100,98
7/1/90	20,58	0,07	0,36	109,50
8/1/90	13,36	0,16	1,20	102,62

Uzorak	mg GAE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/1/135	35,65	0,50	1,41	88,07
2/1/135	21,21	0,58	2,72	103,31
3/1/135	23,44	0,62	2,63	109,56
4/1/135	15,69	0,33	2,08	111,69
5/1/135	22,31	0,55	2,48	111,94
6/1/135	15,62	0,46	2,94	113,11
7/1/135	19,78	0,94	4,73	105,27
8/1/135	13,62	0,02	0,13	104,64

Uzorak	mg GAE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/1/180	38,33	1,60	4,17	94,67
2/1/180	21,25	0,71	3,33	103,50
3/1/180	22,78	0,69	3,02	106,45
4/1/180	15,92	0,14	0,87	113,39
5/1/180	23,62	0,50	2,13	118,53
6/1/180	16,55	0,31	1,85	119,83
7/1/180	20,58	0,13	0,62	109,50
8/1/180	13,39	0,34	2,55	102,82

Sadržaj ukupnih fenola određenih Folin-Ciocalteu metodom za CASE 1 (Tablica 6.) je izražen u miligramima galne kiseline (GAE) po gramu uzorka. Uzorci su označeni na način: broj uzorka/CASE/dan. Najmanji sadržaj fenola u odnosu na zero uzorak (88.07%) je određen za uzorak 1/1/135. Najveći sadržaj fenola u odnosu na zero uzorak (119,83%) je određen za uzorak 6/1/180.

Tablica 7. Rezultati određivanja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom, CASE 4

Uzorak	mg GAE/g uzorka	SD	RSD	
1 / ZERO	40,48	0,14	0,35	
2 / ZERO	20,53	0,69	3,34	
3 / ZERO	21,40	1,06	4,95	
4 / ZERO	14,04	0,68	4,82	
5 / ZERO	19,93	0,92	4,61	
6 / ZERO	13,81	0,67	4,87	
7 / ZERO	18,79	0,52	2,79	
8 / ZERO	13,02	0,34	2,61	
Uzorak	mg GAE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/4/15	38,35	0,04	0,12	94,73
2/4/15	20,58	0,41	1,99	100,26
3/4/15	24,08	0,00	0,00	112,54
4/4/15	16,53	0,14	0,84	117,72
5/4/15	21,77	0,00	0,00	109,24
6/4/15	15,90	0,23	1,46	115,13
7/4/15	19,58	0,32	1,64	104,20
8/4/15	12,83	0,80	6,21	98,54
Uzorak	mg GAE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/4/30	36,51	2,30	6,31	90,19
2/4/30	17,93	0,40	2,25	87,32
3/4/30	23,73	0,48	2,04	110,91
4/4/30	15,24	0,36	2,34	108,53
5/4/30	21,95	0,44	2,03	110,16
6/4/30	15,35	0,71	4,65	111,11
7/4/30	17,96	0,36	2,00	95,56
8/4/30	11,63	0,23	1,95	89,33
Uzorak	mg GAE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/4/45	38,55	0,88	2,30	95,22
2/4/45	18,78	0,00	0,00	91,48
3/4/45	24,41	0,00	0,00	114,09
4/4/45	15,99	0,09	0,58	113,83
5/4/45	23,41	0,30	1,28	117,46
6/4/45	15,52	0,56	3,62	112,36
7/4/45	18,28	0,98	5,36	97,28
8/4/45	12,12	0,17	1,43	93,13

Sadržaj fenola određen Folin-Ciocalteu metodom za CASE 4 (Tablica 7.) je izražen u miligramima galne kiseline (GAE) po gramu uzorka. Najmanji sadržaj fenola u odnosu na zero uzorak (87,32%) je određen za uzorak 2/4/30. Najveći sadržaj fenola u odnosu na zero uzorak (117,72%) je određen za uzorak 4/4/15.

Tablica 8. Rezultati određivanja antioksidativnog kapaciteta TEAC metodom, CASE 1

Uzorak	mg TE/g uzorka	SD	RSD	
1 / ZERO	30,82	0,89	2,90	
2 / ZERO	15,97	0,63	3,94	
3 / ZERO	17,33	0,21	1,23	
4 / ZERO	11,91	0,46	3,84	
5 / ZERO	14,84	0,28	1,92	
6 / ZERO	10,98	0,49	4,48	
7 / ZERO	15,89	0,66	4,16	
8 / ZERO	9,92	0,48	4,80	
Uzorak	mg TE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/1/45	29,13	0,45	1,55	94,53
2/1/45	16,18	0,13	0,82	101,26
3/1/45	18,56	0,31	1,65	107,09
4/1/45	13,18	0,26	1,94	110,66
5/1/45	17,69	0,40	2,24	119,19
6/1/45	12,65	0,43	3,39	115,22
7/1/45	16,63	0,46	2,77	104,63
8/1/45	11,06	0,04	0,39	111,51
Uzorak	mg TE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/1/90	34,28	0,86	2,50	111,25
2/1/90	18,07	0,34	1,87	113,09
3/1/90	21,33	0,50	2,32	123,08
4/1/90	12,02	0,08	0,67	100,94
5/1/90	18,39	0,24	1,32	123,91
6/1/90	13,42	0,00	0,00	122,28
7/1/90	20,44	1,00	4,89	128,61
8/1/90	12,17	0,61	5,01	122,64
Uzorak	mg TE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/1/135	37,88	3,42	9,03	122,91
2/1/135	18,65	1,31	7,04	116,75
3/1/135	23,42	1,86	7,94	135,19
4/1/135	14,70	1,45	9,88	123,37
5/1/135	18,69	1,14	6,11	125,93
6/1/135	16,46	1,25	7,58	149,98
7/1/135	19,89	0,84	4,24	125,17
8/1/135	13,22	0,15	1,11	133,26
Uzorak	mg TE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/1/180	36,44	2,95	8,09	118,25
2/1/180	20,25	0,62	3,07	126,76
3/1/180	20,81	0,73	3,52	120,09
4/1/180	14,46	0,54	3,71	121,36
5/1/180	24,25	0,95	3,94	163,42
6/1/180	17,65	0,26	1,50	160,76
7/1/180	19,12	0,57	3,00	120,33
8/1/180	12,39	0,31	2,49	124,91

Antioksidativni kapacitet određen TEAC metodom za CASE 1 (Tablica 8.) je izražen u miligramima Trolox-a (TE) po gramu uzorka. Najmanji antioksidativni kapacitet u odnosu na zero uzorak (94,53%) je izmjeren za uzorak 1/1/45 (uzorak 1, CASE 1, 45. dan), a najveći antioksidativni kapacitet u odnosu na zero uzorak (163,42%) je izmjeren za uzorak 5/1/180.

Tablica 9. Rezultati određivanja antioksidativnog kapaciteta TEAC metodom, CASE 4

Uzorak	mg TE/g uzorka	SD	RSD	
1 / ZERO	30,82	0,89	2,90	
2 / ZERO	15,97	0,63	3,94	
3 / ZERO	17,33	0,21	1,23	
4 / ZERO	11,91	0,46	3,84	
5 / ZERO	14,84	0,28	1,92	
6 / ZERO	10,98	0,49	4,48	
7 / ZERO	15,89	0,66	4,16	
8 / ZERO	9,92	0,48	4,80	
Uzorak	mg TE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/4/15	30,55	0,05	0,18	99,13
2/4/15	18,23	0,28	1,55	114,12
3/4/15	19,86	0,43	2,17	114,59
4/4/15	13,07	0,21	1,60	109,75
5/4/15	19,28	0,45	2,35	129,91
6/4/15	13,12	0,09	0,65	119,53
7/4/15	16,31	0,49	2,98	102,61
8/4/15	9,02	0,21	2,34	90,88
Uzorak	mg TE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/4/30	30,59	4,46	14,57	99,26
2/4/30	17,05	0,06	0,37	106,73
3/4/30	19,96	2,53	12,67	115,20
4/4/30	13,38	1,19	8,90	112,35
5/4/30	19,79	0,11	0,54	133,40
6/4/30	13,63	0,04	0,33	124,12
7/4/30	17,04	0,55	3,25	107,24
8/4/30	9,10	0,04	0,47	91,76
Uzorak	mg TE/g uzorka	SD	RSD	Udio u odnosu na zero uzorke (%)
1/4/45	30,08	0,06	0,19	97,59
2/4/45	17,21	0,40	2,34	107,73
3/4/45	20,20	0,25	1,24	116,57
4/4/45	13,75	0,06	0,45	115,43
5/4/45	17,52	0,32	1,82	118,08
6/4/45	12,29	0,00	0,00	111,95
7/4/45	16,30	0,30	1,84	102,58
8/4/45	9,29	0,78	8,45	93,61

Antioksidativni kapacitet određen TEAC metodom za CASE 4 (Tablica 9.) je izražen u miligramima Trolox-a po gramu uzorka. Najmanji antioksidativni kapacitet u odnosu na zero uzorak (90,88%) je izmjeren za uzorak 8/4/15, a najveći antioksidativni kapacitet u odnosu na zero uzorak (133,40%) je izmjeren za uzorak 5/4/30.

Tablica 10. Postotna promjena antioksidativnog kapaciteta i ukupnog sadržaja fenola u odnosu na zero uzorke (nakon 180 dana za CASE 1, i 45 dana za CASE 4)

Broj uzorka	Promjena antioksidativnog kapaciteta i ukupnog sadržaja fenola u odnosu na zero uzorke (%)			
	Ukupni fenoli (Folin-Ciocalteu)		Antioksidativni kapacitet (TEAC)	
	CASE 1, 180.dan	CASE 4, 45.dan	CASE 1, 180.dan	CASE 4, 45.dan
1	-5,33	-4,78	18,25	-2,41
2	3,50	-8,52	26,76	7,73
3	6,45	14,09	20,09	16,57
4	13,39	13,83	21,36	15,43
5	18,53	17,46	63,42	18,08
6	19,83	12,36	60,76	11,95
7	9,50	-2,72	20,33	2,58
8	2,82	-6,87	24,91	-6,39

Vidljivo je da je svim uzorcima s ciklodekstrinima u sastavu (tablica 10., uzorci 2-8) nakon 180 dana (CASE 1) porastao ukupan sadržaj fenola u odnosu na zero uzorke. Najveći porast ukupnog sadržaja fenola bilježi uzorak 6 (19,83%). Jedino uzorak 1 nakon 180 dana bilježi pad ukupnog sadržaja fenola od -5,33%.

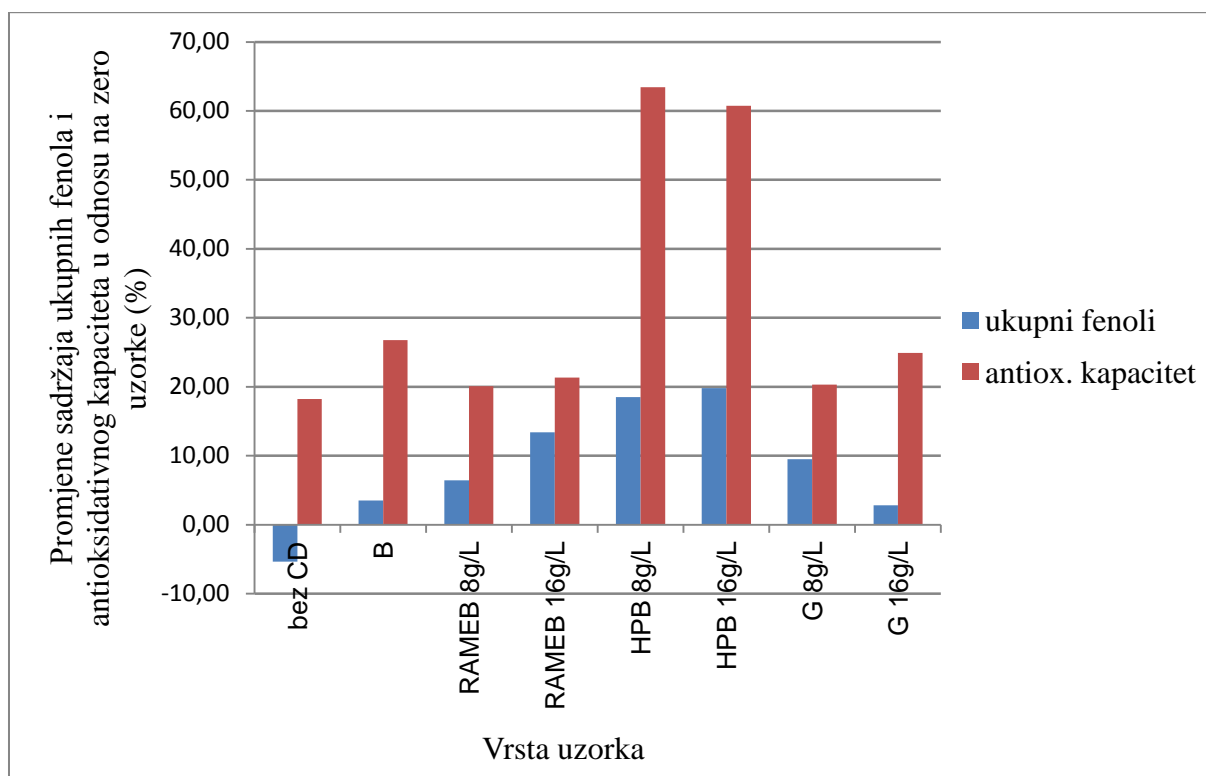
Uzorci 1, 2, 7 i 8 nakon 45 dana (CASE 4) bilježe pad ukupnog sadržaja fenola u odnosu na zero uzorke. Najveći pad je zabilježen za uzorak 2 i iznosi -8,52%. Uzorci 3, 4, 5, i 6 nakon 45 dana bilježe porast ukupnog sadržaja fenola u odnosu na zero uzorke. Najveći porast je zabilježen za uzorak 5 i iznosi 17,46%.

Nakon 180 dana (CASE 1) svi uzorci bilježe porast antioksidativnog kapaciteta u odnosu na zero uzorke, a najveći porast bilježi uzorak 5 (63,42%).

Nakon 45 dana (CASE 4) uzorci 1 i 8 bilježe pad antioksidativnog kapaciteta u odnosu na zero uzorke, a uzorci 2, 3, 4, 5, 6 i 7 bilježe porast antioksidativnog kapaciteta u odnosu na

zero uzorke. Najveći pad antioksidativnog kapaciteta bilježi uzorak 8 (-6,39%) a najveći porast antioksidativnog kapaciteta bilježi uzorak 5 (18,08%).

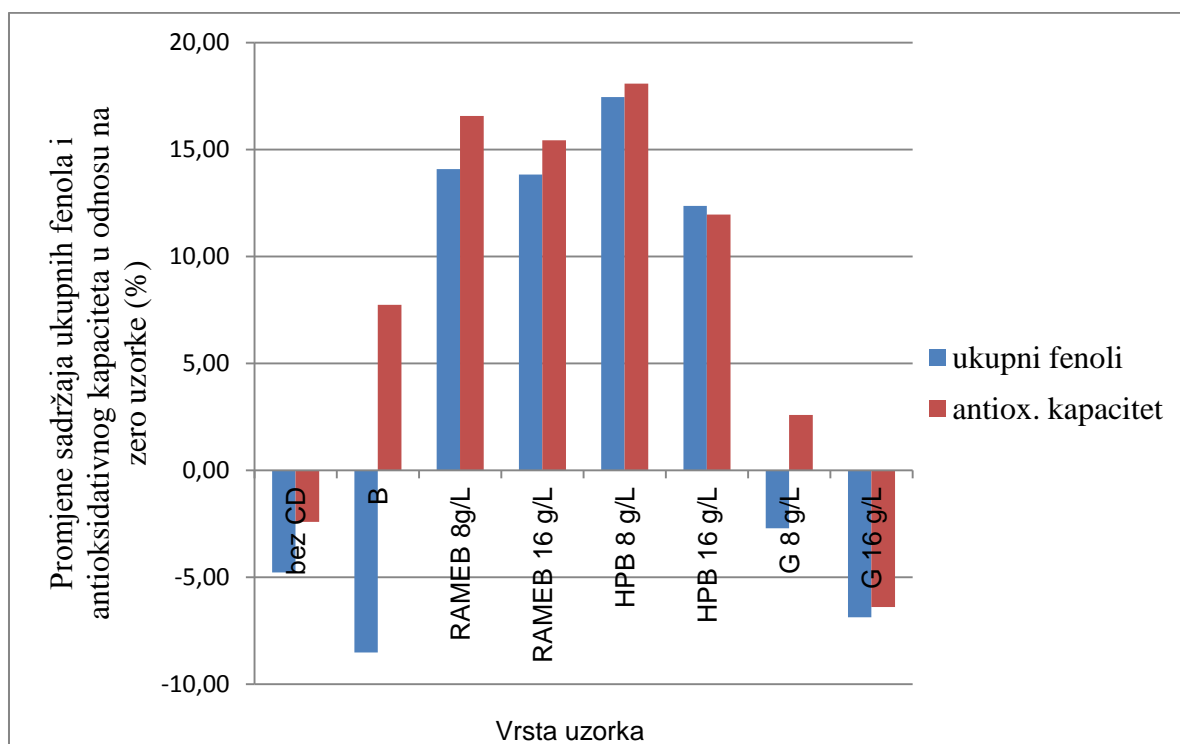
4.2. Rasprava



Slika 11. Grafikon promjene sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta za CASE 1, 180. dan

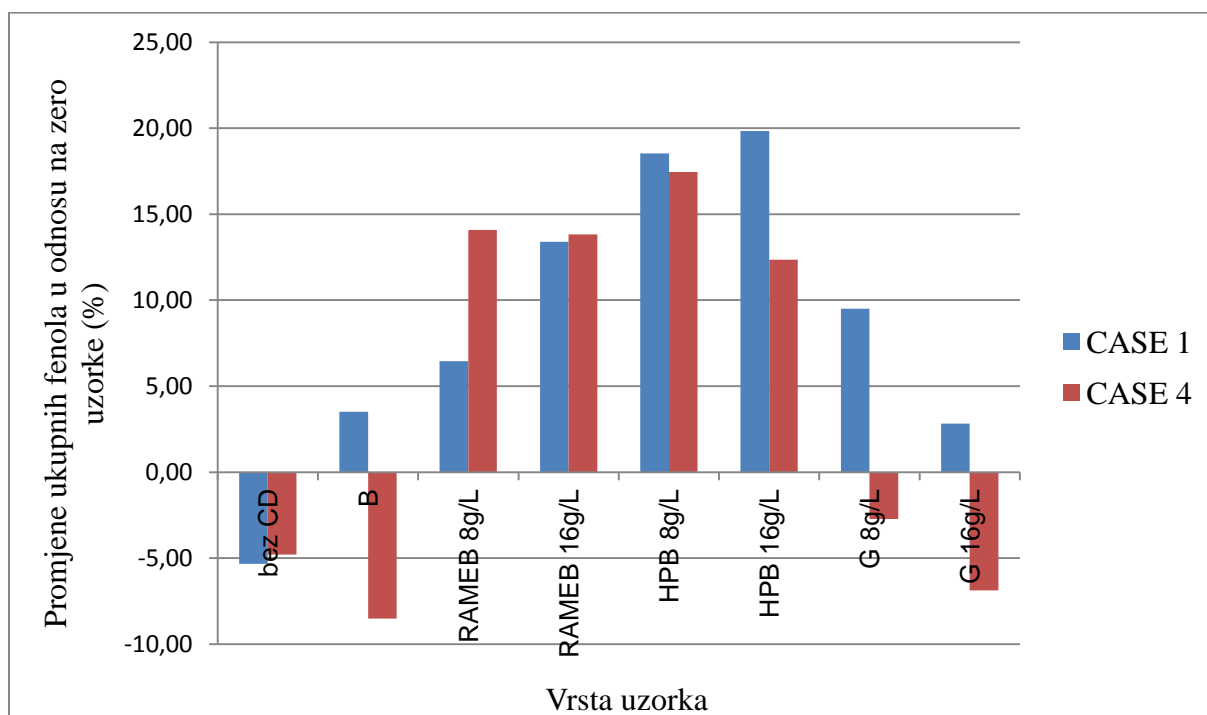
Prema slici 11. se vidi da je ukupan sadržaj fenola s vremenom porastao za sve uzorke osim uzorka bez ciklodekstrina. Na temelju tih rezultata možemo pretpostaviti da tijekom skladištenja u kompleksnom matriksu komine dolazi do razgradnje kompleksnih spojeva polifenolnog tipa u jednostavnije fenole koji su zaštićeni od daljnjeg raspada prisutnošću ciklodekstrina u uzorku. U nativnom uzorku je došlo do pada ukupnog sadržaja fenola jer nije bilo ciklodekstrina koji bi zaštitili novooslobođene fenole. Antioksidativni kapacitet je porastao u svim uzorcima, uključujući i uzorak bez ciklodekstrina. Na temelju toga možemo zaključiti da se iz kompleksnog matriksa komine, osim fenolnih spojeva, oslobađaju i drugi antioksidansi. Tako se može tumačiti činjenica da je u uzorku bez ciklodekstrina došlo do

pada ukupnog sadržaja fenola a porasta antioksidativnog kapaciteta. Nezaštićeni fenoli su se raspali s vremenom, ali antioksidativni kapacitet se povećao na račun drugih novooslobođenih sastavnica komine (TEAC metodom se neselektivno određuje antioksidativni kapacitet). Ukupni fenoli i antioksidativni kapacitet su najviše porasli kod uzoraka s HPB i RAMEB ciklodekstrinima što znači da oni najbolje štite fenole i ostale antioksidativne sastavnice od raspada. Slični su trendovi prisutni u radovima brojnih drugih autora. Primjerice, Mourtzinou i sur. (2007) su pokazali kako oleuropein (jedna od glavnih fenolnih komponenti masline) iz ekstrakta lista masline tvori s β ciklodekstrinom inkluzijske komplekse u omjeru 1:1. Na taj način je povećana stabilnost oleuropeina i njegov doprinos sadržaju ukupnih fenola. Mourtzinou i sur. (2016) su naveli kako formacija inkluzijskih kompleksa između polifenola i raznih vrsta ciklodekstrina povećava topljivost u vodi, zaštitu od oksidacije i raspada uzrokovanog svjetlošću ili toplinom. Celebioglu i sur. (2018a) su pokazali kako timol (fenolna komponenta timijana) tvori s HPB (hidroksipropil β), HPG (hidroksipropil γ) i MB (metil β) ciklodekstrinima inkluzijske komplekse u omjeru 1:1 koji povećavaju antioksidativna svojstva i temperaturnu stabilnost timola.



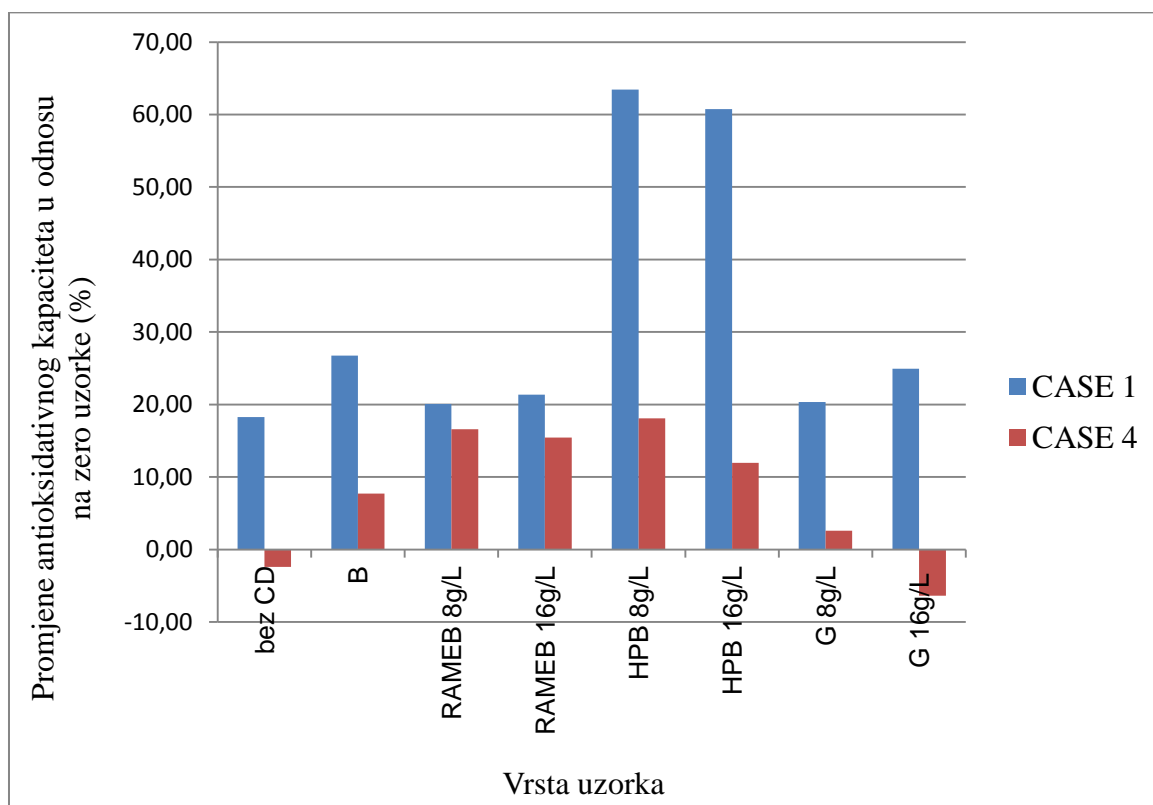
Slika 12. Grafikon promjene sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta za CASE 4, 45. dan

Prema slici 12. se vidi da povišena temperatura ubrzava proces raspada fenola i ostalih antioksidansa pošto su vrijednosti sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta generalno manje nego u CASE-u 1. HPB i RAMEB su pokazali najbolju sposobnost da i na povišenim temperaturama održe manju (u odnosu na CASE 1) ali i dalje znatnu količinu fenola i ostalih antioksidansa. Kod uzoraka bez ciklodekstrina te s β i γ ciklodekstrinima dolazi do smanjenja sadržaja ukupnih fenola u odnosu na zero uzorke. Kod uzorka bez ciklodekstrina i uzorka s većom koncentracijom γ ciklodekstrina također dolazi do pada antioksidativnog kapaciteta u odnosu na zero uzorke. Celebioglu i sur. (2018.b) su istražili učinak HPB (hidroksipropil β), HPG (hidroksipropil γ) i MB (metil β) ciklodekstrina na termalnu stabilnost eugenola i pokazali kako tvorba inkluzijskih kompleksa u omjeru 1:1 s navedenim ciklodekstrinima povećava termalnu stabilnost i antioksidativni kapacitet eugenola. U ovom radu je također vidljivo kako HPB ciklodekstrini povećavaju sadržaj ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet u odnosu na zero uzorke i pri povišenoj temperaturi (Slika 12.). Fernandes i sur. (2018.) su pokazali kako kompleksacija Cy3Glc (cijanidin-3O-glukozida) β ciklodekstrinom povećava termalnu stabilnost tog antocijana borovnice. Na slici 12. je vidljiv pad sadržaja ukupnih fenola za uzorak s β ciklodekstrinom ali porast antioksidativnog kapaciteta u odnosu na zero uzorak iz čega se može zaključiti da je β ciklodekstrin također očuvao određene antioksidativne sastavnice pri povišenoj temperaturi.



Slika 13. Grafikon promjene sadržaja ukupnih fenola za CASE 1(180.dan) i CASE 4(45.dan)

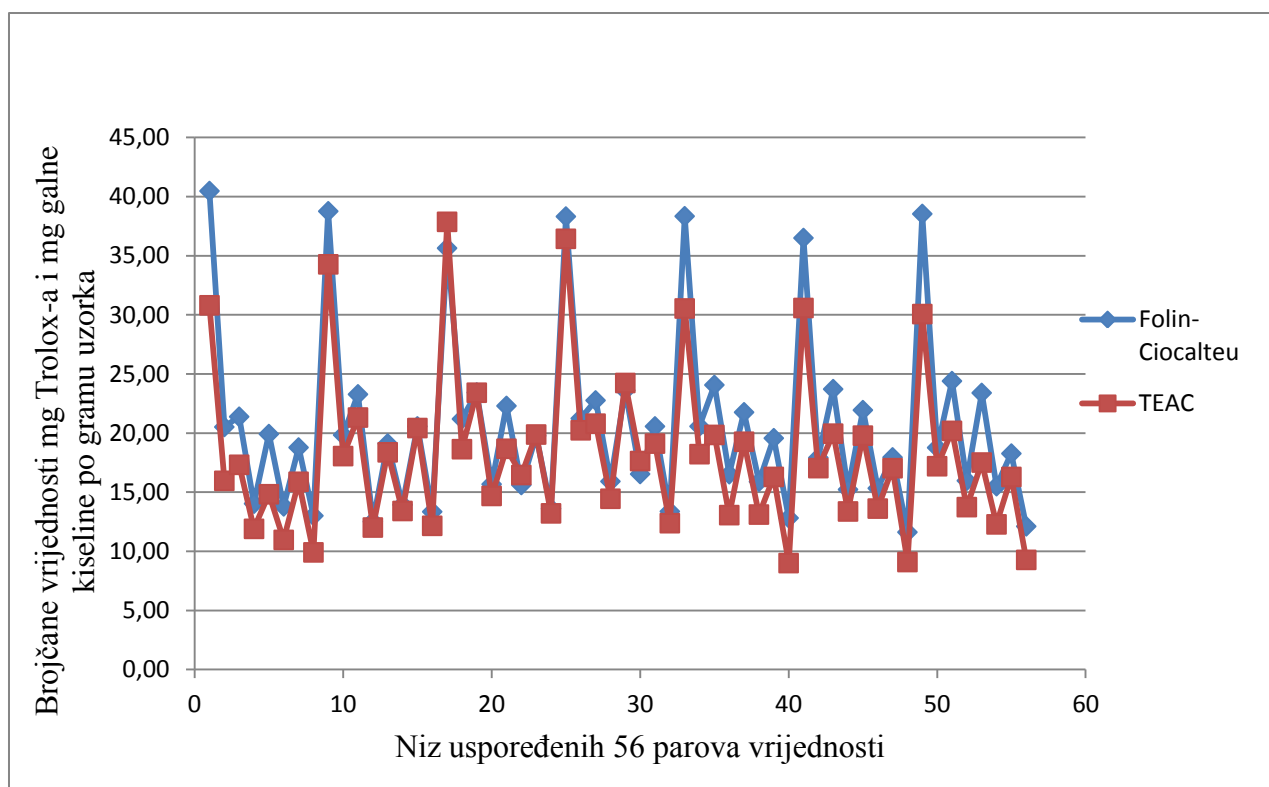
Prema slici 13. se može vidjeti da najveći kumulativni učinak na povećanje sadržaja ukupnih fenola u CASE-u 1 i CASE-u 4 imaju HPB ciklodekstrini. RAMEB ciklodekstrini slijede odmah iza HPB ciklodekstrina. β i γ ciklodekstrini uspijevaju održati količinu fenola većom u odnosu na zero uzorke ali samo pri nižim temperaturama (CASE 1). S povećanjem temperature (CASE 4) dolazi do pada količine fenola u odnosu na zero uzorke. Uzorku bez ciklodekstrina se smanjuje sadržaj ukupnih fenola za oba CASE-a. Dakle, s perspektive očuvanja ukupnih fenola u uzorku, generalno je bolje primijeniti neku vrstu ciklodekstrina nego ih ne primijeniti. U tom smislu su najučinkovitiji HPB ciklodekstrini a potom RAMEB. Nguyen i sur. (2013.) su pokazali da rutin može tvoriti komplekse u stehiometrijskom omjeru 1:1 s β ciklodekstrinima te hidroksipropil α , β i γ ciklodekstrinima. Najveću konstantu stabilnosti su pokazali kompleksni rutina s hidroksipropil β i hidroksipropil γ ciklodekstrinima. Ovakvi kompleksi umjereno štite rutin od termalne razgradnje i UV zračenja ali značajno povećavaju antioksidativni kapacitet.



Slika 14. Grafikon promjene antioksidativnog kapaciteta za CASE 1 (180.dan) i CASE 4 (45.dan)

Prema slici 14. se može vidjeti da su razine antioksidativnog kapaciteta uzoraka s vremenom većinom porasle u odnosu na zero uzorke, bilo za CASE 1 ili 4, što se može tumačiti oslobađanjem raznih antioksidativnih sastavnica iz kompleksnog matriksa komine i njihovim kompleksiranjem ciklodekstrinima. Ipak, najveći kumulativni učinak na povećanje antioksidativnog kapaciteta imaju HPB ciklodekstrini. Odmah iza njih slijede RAMEB ciklodekstrini. β ciklodekstrini imaju manji kumulativni učinak, a γ najmanji. Uzorci bez ciklodekstrina te s γ ciklodekstrinima samo pri nižoj temperaturi zadržavaju antioksidativni kapacitet veći u odnosu na zero uzorke. Lauro i sur. (2017) su pokazali kako upotreba β ciklodekstrina u ekstraktu određene vrste naranče produljava antioksidativnu učinkovitost u odnosu na nativni ekstrakt za 6 sati. García-Padial i sur. (2013) su pokazali da kompleksacija tirosola (fenolna komponenta maslinovog ulja) HPB ciklodekstrinom povećava njegovu antioksidativnu aktivnost izraženu u μM ekvivalenta Trolox-a/ μM tirosola s 0.83 ± 0.03 na 1.20 ± 0.11 . Li Q i sur. (2018) su pokazali da kompleksiranje propil-galata sulfobutileter β , β , HPB i DMB (dimetil- β) ciklodekstrinima povećava sposobnost hvatanja hidroksilnih i superoksidnih radikala. HPB ciklodekstrin je 3. rangiran po povećanju sposobnosti hvatanja hidroksilnih radikala i 2. rangiran po povećanju sposobnosti hvatanja superoksidnih radikala povećavajući njihovu neutralizaciju za 4 puta u odnosu na nativni uzorak propil-galata. β ciklodekstrin se pokazao manje učinkovitim u odnosu na HPB ciklodekstrin. Sličan je odnos učinkovitosti HPB i β ciklodekstrina vidljiv i u ovom radu (Slika 14.).

Najvažniji zaključak svih prethodnih razmatranja je taj da od svih ispitivanih ciklodekstrina HPB ciklodekstrini imaju najbolji učinak na ukupan sadržaj fenola kao i na antioksidativni kapacitet komine masline. Odmah iza njih slijede RAMEB ciklodekstrini. Od svih upotrebljenih ciklodekstrina, HPB i RAMEB su ciklodekstrini izbora za stabilizaciju i očuvanje antioksidativnih karakteristika potencijalnih produkata na bazi komine masline.



Slika 15. Grafički prikaz korelacije između rezultata dobivenih metodom Folin-Ciocalteu i TEAC

Iz slike 15. je vidljivo da postoji zajednički trend u rezultatima dobivenim metodama Folin-Ciocalteu i TEAC, što se dodatno potvrđuje izračunom koeficijenta korelacije (R^2) i P vrijednosti uz pomoć programa Microsoft Office Excel. (Tablica 11.)

Tablica 11. Korelacija rezultata dobivenih metodama Folin-Ciocalteu i TEAC

R^2	P vrijednost
0,9151	<0,05

Tablica 11. pokazuje vrijednosti koeficijenta korelacije ($R^2=0,9151$) i P vrijednost <0,05. Visoka vrijednost koeficijenta korelacije i P-vrijednost manja od 0,05 znače značajnu korelaciju između rezultata dobivenih ovim metodama.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata analize sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom i antioksidativnog kapaciteta TEAC metodom, može se zaključiti sljedeće:

- S vremenom se iz kompleksnog matriksa komine masline oslobađaju fenolni spojevi i ostali spojevi antioksidativnog djelovanja.
- Povišena temperatura uzrokuje ubranu razgradnju fenolnih spojeva i ostalih spojeva antioksidativnog djelovanja u komini masline.
- Uzorci bez ciklodekstrina brže gube antioksidativni kapacitet i brže im se smanjuje sadržaj fenola.
- Ciklodekstrini generalno pomažu očuvanju antioksidativnog kapaciteta i ukupnog sadržaja fenola u komini masline.
- Najbolji ciklodekstrini (od ispitanih) za očuvanje antioksidativnog kapaciteta i ukupnog sadržaja fenola u komini masline su hidroksipropil β ciklodekstrini (HPB) i nakon njih nasumično metilirani β ciklodekstrini (RAMEB).
- Rezultati dobiveni Folin-Ciocalteu i TEAC metodom su u međusobnoj korelaciji

6. LITERATURA

Alagna F, Mariotti R, Panara F, Caporali S, Urbani S, Veneziani G, Esposto S, Taticchi A, Rosati A, Rao R, Perrotta G, Servili M, Baldoni L. Olive Phenolic Compounds: Metabolic and Transcriptional Profiling during Fruit Development. *BMC Plant Biol*, 2012, 12, 162.

Albuquerque JA, Gonzalvez J, Garcia D, Cegarra J. Agrochemical characterization of „alperujo“, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technol*, 2004, 91, 195-200.

Baeta-Hall L, Saagua MC, Bartolomeu ML, Anselmo AM, Rosa MF. Biodegradation of olive oil husks in composting aerated piles. *Bioresource Technol*, 2005, 96(1), 69-78.

Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gomez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A, Lercker G. Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: A Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*, 2007, 12, 1679-1719.

Besnard G, Rubio de Casas R, Christin PA, Vargas P. Phylogenetics of *Olea* (Oleaceae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequences: Tertiary climatic shifts and lineage differentiation times. *Annals of Botany*, 2009, 104(1), 143-160.

Borsani R, Ferrando B. Ultrafiltration plant for olive vegetation waters by polymeric membrane batteries. *Desalination*, 1996, 108, 281.

Boskou D. Olive and olive oil bioactive constituents. Urbana Illinois, AOCS Press, 2015, str.1-31.

Caputo AC, Scacchia F, Pelagagge PM. Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions. *Appl Therm Eng*, 2003, 23, 197-214.

Celebioglu A, Yildiz ZI, Uyar T. Thymol/cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs: Enhanced water solubility, high thermal stability and antioxidant property of thymol. *Food Res Int*, 2018a, 106, 280-290.

Celebioglu A, Yildiz ZI, Uyar T. Fabrication of Electrospun Eugenol/Cyclodextrin Inclusion Complex Nanofibrous Webs for Enhanced Antioxidant Property, Water Solubility, and High Temperature Stability. *J Agric Food Chem*, 2018b, 66(2), 457-466.

Christophoridou S, Dais P, Tseng L-H, Spraul M. Separation and Identification of Phenolic Compounds in Olive oil by Coupling High-performance Liquid Chromatography with

Postcolumn Solid-phase Extraction to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (LC-SPE-NMR). *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 4667-4679.

Della Greca M, Monaco P, Pinto G, Pollio A, Previtera L, Temussi F. Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bull Environ Toxicol*, 2001, 67, 352-359.

De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, 1999, 99, 779-785.

Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Moulti-Mati F, Michaud P. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 2013, 48(10), 1532-1552.

Fernandes A, Rocha MAA, Santos LMNBF, Brás J, Oliveira J, Mateus N, de Freitas V. Blackberry anthocyanins: β -Cyclodextrin fortification for thermal and gastrointestinal stabilization. *Food Chem*, 2018, 245, 426-431.

Fitó M, Cladellas M, De la torre R, i sur. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, 2005, 181(1), 149-158.

Franco MN, Galeano-Diaz T, Lopez O, Fernandez-Bolanos JG, Sanchez J, De Miguel C, Gil MV, Martin-Vertedor D. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Virgin Olive Oil. *Food Chem*, 2014, 163, 289-298.

Garrido Fernandez A, Fernandez-Diez MJ, Adams MR. Table Olives: Production and Processing. *Springer US*, 1997, str. 23-45.

García-Padial M, Martínez-Ohárriz MC, Navarro-Blasco I, Zornoza A. The role of cyclodextrins in ORAC-fluorescence assays. Antioxidant capacity of tyrosol and caffeic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(50), 12260-12264.

Green PS. A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bulletin*, 2002, 57(1), 91-140.

Harman DJ. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Gerontology*, 1956, 11, 298-300.

Kanakakis, P, Termentzi A, Michel T, Gikas E, Halabalaki M, Skaltsounis A. From Olive Drupes to Olive Oil. An HPLC-Orbitrap-based Qualitative and Quantitative Exploration of Olive Key Metabolites. *Planta Med*, 2013, 79, 1576-1587.

Lama-Munoz A, Rodriguez-Gutierrez G, Rubio-Senent F, Palacios-Diaz R, Fernandez-Bolanos JA. Study of the Precursors of the Natural Antioxidant Phenol 3, 4-Dihydroxyphenylglycol in Olive Oil Waste. *Food Chem*, 2013, 140, 154-160.

Landete JM, Cruiel JA, Rodriguez H, de las Rivas B, i sur. Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chem*, 2008, 107, 320-326.

Lauro MR, Crascì L, Giannone V, i sur. An Alginate/Cyclodextrin Spray Drying Matrix to Improve and Antioxidant Efficiency of a Blood Orange By-Product Extract Rich in Polyphenols: MMPs Inhibition and Antiglycation Activity in Dysmetabolic Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:2867630, 1-10.

Li Q, Pu H, Tang P, Tang B, Sun Q, Li H. Propyl gallate/cyclodextrin supramolecular complexes with enhanced solubility and radical scavenging capacity. *Food Chem*, 2018, 245, 1062-1069.

Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Ros E, De Caterina R i sur. Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010, 20(4), 284-294.

Martinez I, Wallace G, Zhang CM, Legge R i sur. Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75, 4175-4184.

Martin Garcia AI, Moumen A, Yáñez Ruiz DR, Molina Alcaide E. Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Anim Feed Sci Technol*, 2003, 107, 61-74.

Martín-peláez S, Covas MI, Fitó M, Kušar A, Pravst I. Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(5), 760-771.

McNamara CJ, Anastasiou CC, O` Flaherty V, Mitchell R. Bioremediation of olive mill wastewater. *Int Biodeter Biodegr*, 2008, 61, 127-134.

Molina-Alcaide E, Yáñez Ruiz DR. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: a review. *Anim Feed Sci Technol*, 2008, 147, 247-264.

Moreno-luna R, Muñoz-hernandez R, Miranda ML, i sur. Olive oil polyphenols decrease blood pressure and improve endothelial function in young women with mild hypertension. *Am J Hypertens*, 2012, 25(12), 1299-1304.

Mourtzinis I, Anastasopoulou E, Petrou A, Grigorakis S, Makris D, Biliaderis CG. Optimization of a green extraction method for the recovery of polyphenols from olive leaf using cyclodextrins and glycerin as co-solvents. *J Food Sci Technol*, 2016, 53(11), 3939-3947.

Mourtzinis I, Salta F, Yannakopoulou K, Chiou A, Karathanos VT. Encapsulation of olive leaf extract in beta-cyclodextrin. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(20), 8088-8094.

Nguyen TA, Liu B, Zhao J, Thomas DS, Hook JM. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chem*, 2013, 136(1), 186-192.

Paredes C, Cegarra J, Roig A, Sanchez-Monedero MA, Bernal MP. Characterization of olive-mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technol*, 1999, 67, 111-115.

Paredes MJ, Moreno E, Ramos-Cormenzana A, Martinez J. Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. *Chemosphere*, 1987, 16(7), 1557-1564.

Perez AG, Leon L, Pascual M, Romero-Segura C, de la Rosa R, Sanz C. Variability of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds in a Segregating Progeny from a Single Cross in *Olea europaea* L. and Sensory and Nutritional Quality Implications. *PLOS ONE*, 2014, 9(3):e92898, 1-10.

Perez-Herrera A, Delgado-Lista J, Torres-Sanchez LA, Rangel-Zuniga OA, i sur. The postprandial inflammatory response after ingestion of heated oils in obese persons is reduced by the presence of phenol compounds. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56, 510-514.

Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res*, 1995, 78(2), 151-160.

Psaltopoulou T, Kostis RI, Haidopoulos D, Dimopoulos M, Panagiotakos DB. Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: a systematic review and a meta-analysis of 13,800 patients and 23,340 controls in 19 observational studies. *Lipids Health Dis*, 2011, 10, 127.

Quiles JL, Farquharson AJ, Simpson DK, Grant I, Wahle KW. Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br J Nutr*, 2002, 88(3), 225-234.

Rana G, Rinaldi M, Introna M. Volatilisation of substances after spreading olive oil waste water on the soil in a Mediterranean environment. *Agr Ecosys Environ*, 2003, 96, 49-58.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(9-10), 1231-1237.

Rodriguez G, Lama A, Rodriguez R, Jimenez A, Guillen R, Fernandez-Bolaños J. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technol*, 2008, 13, 5261-5229.

Saitta M, Di Bella G, Lo Turco V, La Torre LG, Dugo G. Low-level Free Phenols in Sicilian Olive Oils. U: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Preedy VR, Watson RR, urednici, Amsterdam, Academic Press, 2010, str. 187-199.

Salvini S, Sera F, Caruso D, i sur. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr*, 2006, 95(4), 742-751.

Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, i sur. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 2006, 59, 912-921.

Segura-Carretero A, Menendez-Menendez J, Fernandez-Gutierrez A. Polyphenols in Olive Oil: The Importance of Phenolic Compounds in the Chemical Composition of Olive Oil. U: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Preedy VR, Watson RR, urednici, Amsterdam, Academic Press, 2010, str. 167-175.

Shao B. Site-specific oxidation of apolipoprotein A-I impairs cholesterol export by ABCA1, a key cardioprotective function of HDL. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(3), 490-501.

Silva S, Gomes L, Leitao F, Coehlo AV, Vilas Boas L. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Sci Tech In*, 2006, 12, 385-396.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 1965, 16, 145-153.

Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med*, 2003, 348, 2599-2608.

Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D i sur., The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev*, 2005, 18, 98-112.

Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H i sur. Contribution of trends in survival and coronary event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA Project populations. *Lancet*, 1999, 353, 1547-1557.

Vázquez-velasco M, Esperanza díaz L, Lucas R, i sur. Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors. *Br J Nutr*, 2011, 105(10), 1448-1452.

Vinha AF, Ferreres F, Silva BM, Valentao P, Goncalves A, Pereira JA, Oliveira MB, Seabra RM, Andrade PB, Phenolic Profiles of Portuguese Olive Fruits (*Olea europaea* L.): Influences of Cultivar and Geographical Origin. *Food Chem*, 2005, 89, 561-568.

Vlyssides AG, Loizides M, Karlis PK. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *J Clean Prod*, 2004, 12(6), 603-611.

Vlyssides AG, Loizidou M, Gimouhopoulos K, Zorpas A. Olive oil processing wastes production and their characteristics in relation to olive oil extraction methods. *Fresen Environ Bull*, 1998, 7(5-6), 308-313.

Weinbrenner T, Fitó M, De la torre R, i sur. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J Nutr*, 2004, 134(9), 2314-2321.

World olive oil figures, 2018., <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>, pristupljeno 4. 5. 2018.

Yangui T, Dhouib A, Rhouma A, Sayadi S. Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill wastewater as a natural disinfectant and its effect on seeds vigour response. *Food Chem*, 2009, 117, 1-8.

Zrelli H, Matsuka M, Araki M, Zarrouk M, Miyazaki H. Hydroxytyrosol induces vascular smooth muscle cells apoptosis through NO production and PP2A activation with subsequent inactivation of Akt. *Planta Med*, 2011, 77(15), 1680-1686.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Komina masline je kruti ili polukruti nusprodukt ekstrakcije maslinovog ulja i mogla bi se koristiti kao bogat izvor fenola masline i drugih antioksidansa, u svrhu stvaranja prehrambenih proizvoda dodane vrijednosti. Ovaj znanstveni rad istražuje utjecaj različitih vrsta ciklodekstrina, korištenih u pripremi suhih ekstrakata komine masline, na stabilnost završnog proizvoda s obzirom na ukupni sadržaj fenola i antioksidativni kapacitet. Pripremljeno je osam različitih suhih ekstrakata i skladišteno u različitim uvjetima: 4 °C, relativna vlažnost 75%, 180 dana i 60 °C, relativna vlažnost 75%, 45 dana. Uzorkovanje je provedeno u pravilnim vremenskim intervalima. Ukupni sadržaj fenola je određen Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidativni kapacitet je određen TEAC metodom. Rezultati su izraženi u postocima antioksidativnog kapaciteta i ukupnog sadržaja fenola u odnosu na uzorke uzete za mjerenje neposredno nakon pripreme (nulti dan). Iz dobivenih rezultata proizlazi da tijekom skladištenja dolazi do hidrolize nekih sastavnica kompleksnog matriksa, što rezultira početnim porastom udjela slobodnih fenola i drugih antioksidansa. Tijekom skladištenja udio fenola i antioksidacijski potencijal uzoraka se smanjuju. U uzorcima s ciklodekstrinima očuvanje antioksidativnog kapaciteta i sadržaja fenola tijekom skladištenja je značajno bolje u odnosu na nativni uzorak, a učinak je najbolji u uzorcima s HPB i RAMEB ciklodekstrinima. Opažanja se tumače činjenicom da fenoli masline mogu stvarati inkluzijske komplekse s ciklodekstrinima, što ih štiti od razgradnje tijekom skladištenja. Te informacije mogu biti korisne u smislu stvaranja proizvoda dodane vrijednosti. HPB i RAMEB ciklodekstrini bi mogli biti korisni za stabilizaciju i produljivanje roka trajanja potencijalnih nutraceutika na bazi komine masline.

Olive pomace is a solid or semi-solid olive oil extraction by-product and it could be used as a rich source of olive phenols and other antioxidants, for the purpose of creating added value food products. This scientific work explores influence of different sorts of cyclodextrins, used in preparation of olive pomace dry extracts, on stability of final product in terms of total phenol content and antioxidative capacity. Eight different dry extracts were prepared and stored in different conditions: 4 °C, relative humidity 75%, 180 days and 60 °C, relative humidity 75%, 45 days. Sampling was carried out at regular time intervals. Total phenol content was determined via Folin-Ciocalteu method and antioxidative capacity was determined via TEAC method. Results are expressed in percentages of antioxidative capacity and total phenol content in comparison to samples taken for measurement immediately after preparation (day zero). From the results obtained, it arises that hydrolysis of some components of complex matrix occurs during storage, which results in an initial increase in the proportion of free phenols and other antioxidants. During storage, proportion of phenols and antioxidative potential of samples decreases. In samples with cyclodextrins preservation of antioxidative capacity and phenol content during storage is much better in comparison to native sample, and the effect is the best in samples with HPB and RAMEB cyclodextrins. The observations are interpreted by the fact that olive phenols can create inclusion complexes with cyclodextrins, which protects them from degradation during storage. Those information can be useful in terms of creating added value products. HPB and RAMEB cyclodextrins could be useful for stabilization and extending the shelf life of potential olive pomace based nutraceuticals.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za kemiju prehrane
A.Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj različitih vrsta ciklodekstrina na antioksidativni kapacitet i ukupni sadržaj fenola suhih ekstrakata komine masline

Ante Medić

SAŽETAK

Komina masline je kruti ili polukruti nusprodukt ekstrakcije maslinovog ulja i mogla bi se koristiti kao bogat izvor fenola masline i drugih antioksidansa, u svrhu stvaranja prehrambenih proizvoda dodane vrijednosti. Ovaj znanstveni rad istražuje utjecaj različitih vrsta ciklodekstrina, korištenih u pripremi suhih ekstrakata komine masline, na stabilnost završnog proizvoda s obzirom na ukupni sadržaj fenola i antioksidativni kapacitet. Pripremljeno je osam različitih suhih ekstrakata i skladišteno u različitim uvjetima: 4 °C, relativna vlažnost 75%, 180 dana i 60 °C, relativna vlažnost 75%, 45 dana. Uzorkovanje je provedeno u pravilnim vremenskim intervalima. Ukupni sadržaj fenola je određen Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidativni kapacitet je određen TEAC metodom. Rezultati su izraženi u postocima antioksidativnog kapaciteta i ukupnog sadržaja fenola u odnosu na uzorke uzete za mjerenje neposredno nakon pripreme (nulti dan). Iz dobivenih rezultata proizlazi da tijekom skladištenja dolazi do hidrolize nekih sastavnica kompleksnog matriksa, što rezultira početnim porastom udjela slobodnih fenola i drugih antioksidansa. Tijekom skladištenja udio fenola i antioksidacijski potencijal uzoraka se smanjuju. U uzorcima s ciklodekstrinima očuvanje antioksidativnog kapaciteta i sadržaja fenola tijekom skladištenja je značajno bolje u odnosu na nativni uzorak, a učinak je najbolji u uzorcima s HPB i RAMEB ciklodekstrinima. Opažanja se tumače činjenicom da fenoli masline mogu stvarati inkluzijske komplekse s ciklodekstrinima, što ih štiti od razgradnje tijekom skladištenja. Te informacije mogu biti korisne u smislu stvaranja proizvoda dodane vrijednosti. HPB i RAMEB ciklodekstrini bi mogli biti korisni za stabilizaciju i produljivanje roka trajanja potencijalnih nutraceutika na bazi komine masline.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 15 grafičkih prikaza, 11 tablica i 64 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: komina masline, ukupni sadržaj fenola, antioksidativni kapacitet, ciklodekstrini

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Lovorka Vujić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Ivan Pepić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: svibanj, 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of nutritional chemistry
A.Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Influence of different types of cyclodextrins on antioxidative capacity and total phenol content of olive pomace dry extracts

Ante Medić

SUMMARY

Olive pomace is a solid or semi-solid olive oil extraction by-product and it could be used as a rich source of olive phenols and other antioxidants, for the purpose of creating added value food products. This scientific work explores influence of different sorts of cyclodextrins, used in preparation of olive pomace dry extracts, on stability of final product in terms of total phenol content and antioxidative capacity. Eight different dry extracts were prepared and stored in different conditions: 4 °C, relative humidity 75%, 180 days and 60 °C, relative humidity 75%, 45 days. Sampling was carried out at regular time intervals. Total phenol content was determined via Folin-Ciocalteu method and antioxidative capacity was determined via TEAC method. Results are expressed in percentages of antioxidative capacity and total phenol content in comparison to samples taken for measurement immediately after preparation (day zero). From the results obtained, it arises that hydrolysis of some components of complex matrix occurs during storage, which results in an initial increase in the proportion of free phenols and other antioxidants. During storage, proportion of phenols and antioxidative potential of samples decreases. In samples with cyclodextrins preservation of antioxidative capacity and phenol content during storage is much better in comparison to native sample, and the effect is the best in samples with HPB and RAMEB cyclodextrins. The observations are interpreted by the fact that olive phenols can create inclusion complexes with cyclodextrins, which protects them from degradation during storage. Those information can be useful in terms of creating added value products. HPB and RAMEB cyclodextrins could be useful for stabilization and extending the shelf life of potential olive pomace based nutraceutics.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Thesis includes: 42 pages, 15 figures, 11 tables and 64 references. Original is in Croatian language

Keywords: olive pomace, total phenol content, antioxidative capacity, cyclodextrins

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Reviewers: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Lovorka Vujić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Ivan Pepić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

The thesis was accepted: May, 2018.